

**Charakterisierung von Immunglobulinen zur intravenösen
Anwendung vor und nach virusinaktivierenden
Herstellungsschritten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ANDREAS MOTITSCHKE
Gießen 2003

Aus dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen
Betreuer: Prof. Dr. D. Kabelitz

Eingereicht über das Institut für Virologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Charakterisierung von Immunglobulinen zur intravenösen
Anwendung vor und nach virusinaktivierenden Herstellungsschritten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
ANDREAS MOTITSCHKE
Tierarzt aus Darmstadt

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Kabelitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	9
2.1	Bildung und Vorkommen von Antikörpermolekülen	9
2.2	Antikörperstruktur	9
2.3	Antikörpervielfalt.....	12
2.4	Immunglobulinklassen.....	14
2.5	Eigenschaften der IgG-Subklassen	14
2.6	Historie intravenöser Immunglobuline	15
2.7	Herstellung intravenöser Immunglobuline	16
2.8	Indikationen für IVIG	17
2.8.1	Anerkannte Indikationen.....	17
2.8.2	Nicht gesicherte Indikationen	18
2.9	Virussicherheit von Blutprodukten	19
2.10	Virusinaktivierungsverfahren	20
2.10.1	Hitzebehandlung	20
2.10.2	Solvens/Detergenz (S/D)-Behandlung.....	21
2.10.3	Nanofiltration.....	22
2.10.4	Andere Herstellungsschritte mit Virusinaktivierungspotential.....	23
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Probenmaterial	25
3.1.1	Immunglobulin-Präparate	25
3.1.2	Plasmapoolproben.....	26
3.2	Analyse der Proteinzusammensetzung	29
3.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.2.2	Immunoblotting (Western Blot).....	33
3.2.3	IgG-Subklassenbestimmung	34
3.3	Bestimmung spezifischer Antikörpergehalte in IVIG	36
3.3.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	36
3.3.2	Anti-Parvovirus B19-ELISA	38
3.3.3	Anti-HAV-ELISA.....	39
3.3.4	Anti-HBsAg-EIA	40
3.3.5	Anti-VZV-ELISA	41
3.3.6	Anti-CMV-ELISA	43
3.3.7	Hämolyse-Hemmungsteste (HHT)	44
3.3.8	Anti-Staphylolysin-HHT	44
3.3.9	Anti-Streptolysin-HHT	46
3.3.10	Hämagglutinations-Hemmungstest (HAHT).....	48
3.3.11	Anti-Röteln-HAHT	48
3.4	Nachweis viraler Nukleinsäure in IVIG	51
3.4.1	Parvovirus B 19-PCR.....	51
3.5	Funktionelle Prüfung der IVIG	56
3.5.1	Fc-Funktionstest.....	56
3.5.2	Fc-Rezeptor-Bindungstest	61
3.5.3	Phagozytostest.....	65
3.6	Statistik	69

4	Ergebnisse.....	70
4.1	Analyse der Proteinzusammensetzung	70
4.1.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.1.2	Immunoblotting (Western Blot).....	76
4.1.3	IgG-Subklassenbestimmung	79
4.2	Bestimmung spezifischer Antikörper in IVIG.....	85
4.2.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	86
4.2.2	Anti-Parvovirus B19-ELISA	86
4.2.3	Anti-HAV-ELISA.....	95
4.2.4	Anti-HBsAg-EIA	101
4.2.5	Anti-VZV-ELISA	105
4.2.6	Anti-CMV-ELISA	109
4.3	Hämolyse-Hemmungsteste (HHT)	114
4.3.1	Anti-Staphylolysin-HHT	114
4.3.2	Anti-Streptolysin-HHT	118
4.4	Hämagglutinations-Hemmungstest (HAHT).....	123
4.4.1	Anti-Röteln-HAHT	123
4.5	Nachweis viraler Nukleinsäure in IVIG	127
4.5.1	Parvovirus B 19-PCR.....	127
4.6	Funktionelle Prüfung der IVIG.....	132
4.6.1	Fc-Funktionstest.....	132
4.6.2	Fc-Rezeptor-Bindungstest	138
4.6.3	Phagozytostest.....	148
5	Diskussion	156
5.1	Methodenauswahl	160
5.1.1	Charakterisierung polyklonaler Antikörper	161
5.1.2	Einfluss der Plasmaherkunft auf den Antikörpergehalt.....	163
5.2	Analyse der Proteinzusammensetzung	165
5.2.1	SDS-PAGE: Einfluss der Virusinaktivierung/Eliminierung.....	165
5.2.2	IgG-Subklassenbestimmung	170
5.2.3	Klinische Relevanz der IgG-Subklassenverteilung	173
5.3	Bestimmung spezifischer Antikörpergehalte in IVIG	174
5.3.1	Anti-Parvovirus B19-Gehalt in IVIG	176
5.3.2	Parvovirus B19-DNA in Plasmapools und IVIG.....	177
5.3.3	Anti-Röteln-HAHT	178
5.4	Funktionelle Prüfung der IVIG.....	179
5.4.1	Fc-Funktionstest.....	180
5.4.2	Fc-Rezeptor-Bindungstest	183
5.4.3	Phagozytostest.....	191
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	197
7	Summary and Conclusions	201
8	Literaturverzeichnis	204
9	Anhang.....	219

Abkürzungsverzeichnis

ACA	antikomplementäre Aktivität
ACD	Acidum-Citricum-Dextrose
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BRP	Biologische Referenz-Präparation
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
CD	Differenzierungscluster (clusters of differentiation)
CH ₅₀	Komplementdosis (die 50% einer Erythrozytensuspension lysiert)
CMV	Cytomegalie Virus
CPMP	Committee for Proprietary Medical Products
DAB	Deutsches Arzneibuch
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Einheit(en)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme immunosorbent assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F(ab) ₂	Immunglobulinfragment (antigenbindende Region)
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
Fc	Immunglobulinfragment (kristallisierbare Region)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward light scatter)
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAV	Hepatitis A Virus
HAHT	Hämagglutinations-Hemmungstest
HBV	Hepatitis B Virus
HBsAg	Hüllantigen des HBV (Hepatitis B surface antigen)
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-ethansulfonsäure
HHT	Hämolyse-Hemmungstest
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
H-Kette	schwere (heavy) Kette eines Immunglobulin-Moleküls
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSA	human Serumalbumin

Abkürzungsverzeichnis

HSV	Herpes Simplex Virus
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheit(en)
Ig	Immunglobulin
IgA (G, M, D, E)	Immunglobulin der Klasse A (G, M, D, E)
IU	Internationale Einheit (international unit)
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
l	Liter
L-Kette	Leichte (light) Kette eines Immunglobulin-Moleküls
min	Minute(n)
mg	Milligramm
M	Molar
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
mA	Milliampere
mAk (mAb)	monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies)
ml	Milliliter
n	Nano
N	Normal
NANBH	Non A Non B Hepatitis
OD	Optische Dichte
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PEG	Polyethylenglycol
RID	Radiale Immundiffusion
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
S/D	Lösungsmittel/Detergenz (solvent/detergent)
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNBP	Tri-n-butylphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

Abkürzungsverzeichnis

vs	versus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
VK %	Variationskoeffizient in Prozent
W/V	Masse pro Volumen (weight per volume)
x g	-fache Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

Als Folge der immunologischen Auseinandersetzung mit einem körperfremden Stoff (Antigen) ist ein immunkompetenter Organismus in der Lage spezifische Glykoproteine zu bilden, die Antikörper oder Immunglobuline genannt werden. In der Infektionsabwehr besitzen Antikörper die Aufgabe den Organismus nach einer überstandenen Infektion vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger zu schützen. Sie bilden die Grundlage der spezifischen humoralen Immunität bei Tier und Mensch.

Die Wirkung der Antikörpermoleküle im Abwehrgeschehen beruht im wesentlichen auf zwei Eigenschaften: Zum einen sind Antikörper in der Lage das Antigen mittels einer Bindungsstelle spezifisch zu binden, zum anderen lösen sie Effektorfunktionen aus, die nach Antigenbindung durch den als Fc-Teil bezeichneten Bereich des Antikörpermoleküls vermittelt werden. Eine der wichtigsten Effektorfunktionen ist die Aktivierung des Komplementsystems über eine spezifische Bindungsstelle im Fc-Teil des Antikörpers. Die Aktivierung führt einerseits zur Lyse von Bakterien und infizierten Zellen, andererseits aber auch zur Bildung von chemotaktischen Substanzen und in Folge zu einer besseren Aufbereitung des Antigens für phagozytierende Zellen. Effektorzellen wie z.B. Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen, die Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche tragen, werden durch Interaktion mit dem Fc-Teil der Antikörper aktiviert. Mit Hilfe dieses Mechanismus werden z.B. Antigene nach Reaktion mit dem Antikörper durch phagozytierende Zellen beschleunigt aufgenommen und somit aus dem Organismus durch Abbau eliminiert. Ein ähnlicher Mechanismus liegt auch bei der Lyse von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch NK-Zellen zugrunde.

Die Bildung von Antikörpern beginnt auf einen primären Antigenreiz hin nach einigen Tagen (Latenzperiode) als Primärreaktion. Wird der Organismus zum zweiten Mal mit dem gleichen Antigen konfrontiert, erfolgt die Antikörperbildung aufgrund der Entwicklung von Gedächtniszellen schneller und mit höherem Titer (Sekundärreaktion), wodurch eine über Monate oder Jahre anhaltende spezifische Immunität erreicht werden kann.

Die durch die Bildung von Antikörpern erworbene spezifische Immunität ist auf ein ungeschütztes Individuum übertragbar. Dieser als passive Immunisierung bezeichnete Vorgang verleiht dem Empfänger einen temporären, spezifischen Schutz gegen ein oder mehrere Krankheitserreger bzw. Toxine. Im Gegensatz zur aktiven Immunisierung erlischt die Schutzwirkung bei der passiven Immunisierung jedoch mit dem Abbau der übertragenen körperfremden Antikörper.

Eine passive Immunität kann entweder natürlich oder künstlich erworben werden. Unter natürlichen Bedingungen werden humorale Antikörper diaplazentar oder kolostral von der Mutter auf den Fetus bzw. das Neugeborene übertragen. Beim Vogel erfolgt die Übertragung der Antikörper transovariell vom Eidotter auf das Küken. Die natürlich erworbene passive Immunität setzt voraus, dass die Mutter bzw. das Muttertier durch eine Infektion oder Impfung bereits schützende Antikörper gebildet hat. Künstlich wird eine passive Immunität durch die Übertragung von Antikörpern eines bereits immunen Spenders auf einen noch ungeschützten Empfänger erworben. Die Übertragung erfolgt meist in Form von Immunsereen oder Immunglobulinen. Während Immunsereen Antikörper und weitere Proteine des Serums enthalten, stellen Immunglobuline konzentrierte und gereinigte Antikörperpräparationen dar.

Das klassische Anwendungsgebiet von Immunsereen bzw. Immunglobulinen liegt in der Prophylaxe und Therapie von viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten bei Tier und Mensch. Darüber hinaus werden Antikörperpräparate wegen ihrer antitoxischen (z.B. Digitalis-Antidot) und immunmodulatorischen Wirkung eingesetzt. Als Beispiel für letzteres sei die Behandlung der idiopathischen Thrombozytopenie des Menschen mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) genannt. Die stark verringerte Thrombozytenzahl als Folge eines vermehrten phagozytären Abbaus der Thrombozyten in der Milz, kann durch die Behandlung mit hochdosiertem IVIG oft bereits nach wenigen Tagen deutlich erhöht werden (TELLING, 2001). Obwohl der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus im Detail nicht genau geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass Fc-Rezeptoren der Phagozyten durch Immunglobuline blockiert werden, wodurch die Phagozytoseaktivität gehemmt wird (BUSSEL, 2000; SAMUELSSON et al., 2001).

Auch in der Veterinärmedizin wurden humane IVIG zur experimentellen Therapie immunvermittelter Krankheiten eingesetzt (SCOTT-MONCRIEFF et al., 1995, 1997). REAGAN (1998) zeigte, dass humane IVIG ebenfalls an Fc-Rezeptoren von caninen Lymphozyten und Monozyten binden und in der Lage sind, die Phagozytose antikörperbeschichteter Erythrozyten zu hemmen. Humane IVIG könnten daher zur Kurzzeitbehandlung für Hunde mit immunvermittelter hämolytischer Anämie von Nutzen sein.

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Immunsereen oder Immunglobulinen dient Blut, Plasma oder Serum von Tieren oder Menschen. Seren tierischer Herkunft werden bei Mensch und Tier eingesetzt. Zur Anwendung am Menschen werden z.B. Antiseren gegen bestimmte Toxine z.B. Schlangengifte, Botulismus- oder Diphtherietoxin hergestellt, zu deren Gewinnung meist Pferde mit den spezifischen Toxinen immunisiert werden. Zur Anwendung am Tier stehen ebenfalls Pferdeseren zur Verfügung, die hauptsächlich zur Prophylaxe oder Therapie von Infektionskrankheiten eingesetzt werden. Die Anwendungsbereiche umfassen z.B.: Endotoxämie, Endotoxinschock beim Hund und Pferd, Panleukopenie und Katzenschnupfen bei Katzen, Tetanus beim Pferd, Rota/Coronaviruserkrankungen beim Rind, Pasteurella-Infektionen beim Pferd, Schaf und Schwein, E. coli-Infektionen bei Rind und Schwein.

Neben speziesfremden (heterologe) werden auch spezieseigene (homologe) Immunsereen angeboten, wie z.B. Stagloban SHP, dass eine passive antivirale Immunität gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis und Parvovirose beim Hund bewirkt.

Vom Menschen stammende Immunglobuline werden in der Regel durch Fällungs- und Aufreinigungsprozeduren aus einer Vielzahl gespendeter und anschließend vereinter Plasmen (Plasmapool) gewonnen. Je nach Anteil spezifischer Antikörper lassen sich die Präparate in normale oder spezifische Immunglobuline einteilen. Normale Immunglobuline enthalten alle in der Spenderpopulation vorkommenden Antikörper gegen verschiedene Antigene, während spezifische Immunglobuline einen hohen Titer gegen ein bestimmtes Antigen aufweisen.

Die Gewinnung spezifischer Immunglobulin-Präparate erfolgt entweder durch gezielte Immunisierung der Spender oder durch Auswahl von Spenden, die einen hohen Titer gegen das gesuchte Antigen aufweisen. Spezifische Immunglobuline stehen in der Humanmedizin z.B. zur Prophylaxe und Therapie von Tetanus, Tollwut, Hepatitis A und B, FSME, Varizella-Zoster, Röteln u.a. zur Verfügung.

Dem Nutzen einer Immunglobulin-Behandlung stehen jedoch auch Risiken gegenüber. Neben möglichen Unverträglichkeiten können Krankheitserreger durch Immunglobulin-Präparate übertragen werden, falls das Ausgangsmaterial durch einen unerkannt infizierten Spender mit Erregern kontaminiert wurde. Das Risiko einer Kontamination steigt mit der Anzahl der für die Gewinnung und Herstellung der Immunglobuline verwendeten Plasmen. Normale humane intravenöse Immunglobuline zählen zu den Immunglobulin-Präparationen mit dem höchsten Bedarf an Plasmaspenden. Das Deutsche Arzneibuch (DAB 10) schreibt für diese Präparate vor, dass sie aus dem Plasma von mindestens 1000 Spendern hergestellt werden müssen. Dagegen werden zur Herstellung tierischer Antikörperpräparate zahlenmäßig nur relativ wenige Spendertiere benötigt, die zudem aus überwachten Beständen stammen.

Viren zählen in der Transfusionsmedizin zu den bedeutsamsten Krankheitserregern, die durch Blutprodukte übertragbar werden können. Aufgrund ihrer geringen Größe ist eine Abreicherung bzw. Abtrennung von Viren aus kontaminiertem Material durch physikalische Verfahren, wie z.B. Zentrifugation oder Filtration schwieriger als bei Bakterien. Darüber hinaus stehen dem Arzt nach einer eventuellen Infektion nur eingeschränkt gegen Viren wirksame Medikamente zur Verfügung, während bakterielle Infekte in der Regel mit Antibiotika therapiert werden können. Im Falle einer Übertragung von Krankheitserregern durch kontaminierte Immunglobuline besitzen die intravenös applizierbaren Präparate den Nachteil, dass eine schnelle Erregerverteilung im Organismus des Empfängers stattfindet. Obwohl IVIG-Präparate hinsichtlich der Virussicherheit als relativ sicher eingestuft wurden, kamen Zweifel daran auf, als veröffentlicht wurde, dass es 1994 zu Übertragungen von Hepatitis C durch einige Chargen des IVIG-Präparates Gammagard (Baxter Healthcare Corporation) kam.

PCR-Untersuchungen bestätigten, dass in den betreffenden Chargen HCV-RNA nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu einer erneuten Diskussion über die Virussicherheit von IVIG (GOMPERTS, 1996; BRESEE et al., 1996; BERGER, 1997). Als Folge dessen wurde von Seiten der pharmazeutischen Industrie und den Zulassungsbehörden die Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte bei der Herstellung von IVIG gefordert (YAP, 1996; UEMURA, 1994). Im Laufe der letzten Jahre wurden bei vielen Präparaten zusätzliche Virusinaktivierungsschritte in den Produktionsprozess integriert. Die damit verbundene Herstellungsänderung ließ Fragen nach dem Einfluss der zusätzlichen Virusinaktivierungsschritte auf die Funktion und Eigenschaften der IVIG-Präparate aufkommen.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Virusinaktivierungsverfahren auf die Eigenschaften und Funktionen an normalen intravenösen Immunglobulin-Präparaten zu untersuchen und vergleichend darzustellen. Darüber hinaus sollten weitere IVIG mit in die Untersuchungen einbezogen werden, die sich im Herstellungsverfahren und durch chemische bzw. enzymatische Behandlungen unterscheiden. Eine systematische Charakterisierung erschien aus folgenden Gründen notwendig: Seitens der Ärzte werden Anforderungen an IVIG gestellt, die weder durch die vorliegende Arzneimittelmonographie noch durch Angaben aus der Zulassungsdokumentation berücksichtigt werden. Die Anforderungen umfassen ein definiertes Antikörperspektrum gegen klinisch relevante bakterielle und virale Erreger, bestimmte biologische Funktionen, wie Opsonisierung und Bakterizidie der Präparate in Abhängigkeit der gewählten Virusinaktivierung oder Molekülmodifikation. Zur biologischen Charakterisierung enthält die Arzneibuchmonographie zwar Forderungen, die Produkte mit gleichbleibender biochemischer Qualität und Reinheit gewährleisten (Tabelle 1), es werden jedoch nur wenig klinisch relevante Daten gefordert. So ist die Wirksamkeit lediglich anhand einer mindestens 3-fachen Anreicherung der Antikörper im Endprodukt gegenüber dem Ausgangsmaterial nachzuweisen. Der Nachweis ist durch die Bestimmung des Antikörpergehaltes gegen ein virales und ein bakterielles Antigen zu erbringen. Der Hersteller kann hierbei jedoch frei die Antikörperspezifität und die Bestimmungsmethode wählen. Ein Vergleich verschiedener Präparate ist daher nur ausnahmsweise, meistens aber nicht möglich.

Tabelle 1 Anforderungen und Prüfungen gemäß Monographie (DAB 10) für Immunglobuline vom Menschen zur intravenösen Anwendung

Prüfung auf	Forderung der Monographie	Methode
Identität	Human Protein	Immundiffusion
	Hauptbande: hum. IgG auch hum. Albumin	Acetatfolien- elektrophorese
Reinheit		
Löslichkeit (Lyophilisate)	30 min bei 20-25°C	
pH-Wert	4,0 bis 7,4	
Osmolalität	≥ 240 mosmol/kg	
Gesamtprotein	≥ 3% (W/V) 90-110% des deklarierten Wertes	Kjeldahl, (auch Biuret, Laury und andere)
Proteinzusammensetzung	entsprechend Deklaration	
Wasser	< 3% (bei Lyophilisaten)	Restfeuchte
Molekülgrößenverteilung	Monomere und Dimere > 90% Polymere und Aggregate < 3%	HPLC
Antikomplementäre Aktivität	Komplementverbrauch < 50% (1 CH ₅₀ /mg Ig)	ACA
Präkallikrein-Aktivator	höchstens 35 I.E./ml	
Anti-A und Anti-B- Hämagglutinine	keine Agglutination bei 1:64	
HBsAg-Antikörper	0,5 IE pro Gramm Ig	
Fc-Funktionstest	mind. 60% des Ref.- Materials	Fc-Funktionstest
Subklassenzusammensetzung	ist zu bestimmen	
Sterilität	steril	Prüfung nach DAB
Pyrogene	frei von Pyrogenen	Pyrogentest nach DAB
Wirksamkeit	3-fache Anreicherung eines viralen und bakteriellen Ak	

Einige IVIG-Präparate werden zur Verbesserung der intravenösen Verträglichkeit chemisch oder enzymatisch modifiziert. Die in der Monographie für IVIG beschriebenen Anforderungen gelten jedoch nicht für chemisch oder enzymatisch modifizierte Präparate. Damit fehlen Daten, die einen Vergleich zwischen modifizierten und nicht modifizierten IVIG-Präparaten erlauben.

Biologische Eigenschaften der Präparate, wie die Fc-Funktion sind lediglich während der Entwicklung zu definieren. Eine vergleichende Darstellung verschiedener IVIG ist auch hier nur vereinzelt und für wenige Präparate beschrieben worden. Die Kliniken müssen zunehmend auf ökonomische Zwänge achten und fragen daher nach klinisch relevanten Funktionen und Charakteristika von IVIG, vor allem auch im Vergleich der einzelnen Herstellungsverfahren. Da humane IVIG zur Therapie immunvermittelter hämolytischer Anämien bei Hunden eingesetzt werden könnten, erscheint es im Hinblick auf Auswahl eines Präparates als sinnvoll, die spezifischen Charakteristika der Präparate zu kennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden humane IVIG-Präparate von verschiedenen pharmazeutischen Unternehmen untersucht, die zur Herstellung der IVIG unterschiedliche Fraktionierungsmethoden und Virusinaktivierungsverfahren anwenden. Um den Einfluss von Virusinaktivierungsverfahren auf die Qualität und Funktion der IVIG zu bestimmen, wurden mehrere Chargen des gleichen Herstellers untersucht, die vor und nach Einführung von zusätzlichen Virusinaktivierungsverfahren hergestellt wurden. Die Analyse der Proteinzusammensetzung erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und wurde durch die Bestimmung der IgG-Subklassen-Zusammensetzung mittels radialer Immundiffusion ergänzt.

Um den Einfluss von Virusinaktivierungs- bzw. Herstellungsverfahren auf die antigenbindende Region der Antikörpermoleküle zu untersuchen, wurden die Antikörpergehalte gegen verschiedene bakterielle und virale Antigene mittels gängiger serologischer Methoden (ELISA, HHT, HAHT) in den IVIG-Präparaten bestimmt.

Ein besonderes Interesse galt dabei den Antikörpergehalten gegen Parvovirus B19 und das Hepatitis A Virus. Da beide Viren keine Lipidhülle besitzen, sind Virusinaktivierungsverfahren, die auf der Auflösung der Virus-Lipidhülle durch Lösungsmittel und Detergenzien beruhen, wenig effektiv (BARRETT et al., 1996; ROBERTSON und ERDMAN, 2000). Man geht jedoch davon aus, dass die Virussicherheit der Präparate durch einen Mindestgehalt an Antikörpern gegen Parvovirus B19 und Hepatitis A Virus erhöht wird. Um die Frage nach der Virusbelastung mit Parvovirus B19 zu klären, sollten darüber hinaus die verwendeten Ausgangsmaterialien (Plasmapools) und die daraus hergestellten Endprodukte (IVIG-Präparate) mittels PCR auf Parvovirus B19-Genom untersucht werden.

Um den Einfluss von Virusinaktivierungs- und Herstellungsverfahren auf die IVIG zu untersuchen, wurden weitere Testmethoden angewandt, die die Integrität des Fc-Teils durch Testung seiner biologischen Funktionen prüfen sollten. Mit dem Fc-Funktionstest, der als Referenzmethode in der Arzneibuchmonographie zum Nachweis der Fc-Funktion von IVIG gefordert wird, wurde die Fähigkeit der IVIG untersucht, das Komplementsystem nach Antigenbindung zu aktivieren. Die Interaktion von Fc-Teilen mit Fc-Rezeptoren wurde darüber hinaus mit einer neuen, antigenunabhängigen Methode (Fc-Rezeptorbindungstest) untersucht. Schließlich wurde die phagozytosefördernde Wirkung der IVIG anhand eines modernen Phagozytostests (FACS-Messung) geprüft und vergleichend dargestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen somit die Beurteilung des Einflusses von Virusinaktivierungs- bzw. Herstellungsmethoden nicht nur auf die Qualität, sondern auch auf die biologische Funktionalität von IVIG.

2 Literaturübersicht

2.1 Bildung und Vorkommen von Antikörpermolekülen

Antikörper werden von Plasmazellen sezerniert, die sich nach Antigenkontakt aus B-Lymphozyten differenzieren (JANEWAY, 1995). Jeder B-Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche Immunglobuline von einer einzigen, bestimmten Spezifität, die als Rezeptoren wirken und nur ihr entsprechendes Antigen binden. Trifft ein B-Lymphozyt auf sein passendes Antigen kommt es zur Proliferation dieser Zelle und es entsteht ein B-Zellklon. Durch Differenzierung entstehen daraus Plasmazellen, die Immunglobuline mit gleicher Spezifität sezernieren. Die Immunglobuline kommen in der Interstitial-Flüssigkeit von Geweben vor, in denen sich antikörperproduzierende B-Zellen befinden. Als frei zirkulierende Antikörper befinden sie sich hauptsächlich im Blutplasma. Des weiteren lassen sich Antikörper vom Typ IgA in den Sekreten der Schleimhäute und in Milch nachweisen. Neben frei zirkulierenden Antikörpern, kommen Antikörpermoleküle membran-gebunden an der Oberfläche von B-Lymphozyten oder innerhalb dieser Zellen, am Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat vor. Einige Zellarten, die selbst keine Antikörper produzieren, sind in der Lage Antikörper durch spezielle Fc-Rezeptoren zu binden. Daher befinden sich Antikörper auch an der Oberfläche einiger Immuneffektor-Zellen, wie mononukleäre Phagozyten, Natürliche Killerzellen und Mastzellen.

2.2 Antikörperstruktur

Antikörper sind Glykoproteine mit einer charakteristischen Molekülform, die einem Y gleicht (Abbildung 1). Die Grundstruktur besteht aus zwei identischen L-Ketten, deren Molekulargewicht ca. 24 kD beträgt, und zwei identischen längeren H-Ketten mit einem Molekulargewicht von etwa 50 bis 70 kD. Ein IgG-Antikörper besteht jeweils aus zwei L-Ketten und zwei H-Ketten (zusammen ca. 150 kD). Die L-Ketten sind jeweils über Disulfidbrücken an die H-Ketten gebunden. Die beiden H-Ketten sind wiederum untereinander über meist mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden.

Innerhalb der L- und H-Ketten werden Bereiche (Domänen) unterschieden, in denen sich bestimmte Aminosäuremuster wiederholen, die als konstante Regionen (C-Region) bezeichnet werden (SEILER, 1982). Andere Bereiche dagegen sind besonders reich an Aminosäurevariationen, so dass diese als variable Regionen (V-Region) bezeichnet werden (ROITT, 1988). Die Bereiche mit der höchsten Aminosäurevariabilität befinden sich an den N-terminalen Enden der Antikörpermoleküle. In diesem Bereich findet die spezifische Antigenbindung statt. Für die Spezifität der Antigenbindung ist die dreidimensionale Struktur der F(ab)-Region eines Antikörpermoleküls verantwortlich, die durch die Aminosäuresequenz festgelegt ist.

Die Bindung an ein Antigen kann monovalent erfolgen, wenn nur ein Arm des F(ab)-Teils an der Bindung beteiligt ist. Bei der bivalenten Bindung sind beide Arme an der Bindung eines Antigens beteiligt. Die beiden Arme des F(ab)-Abschnittes sind über eine Gelenkregion (Hinge) flexibel miteinander verbunden, was eine flexiblere Anpassung an die räumliche Struktur des Antigens erlaubt.

Bei den L-Ketten werden 2 Typen (Kappa oder Lambda) unterschieden. Jedes Antikörpermolekül besitzt entweder L-Ketten vom Typ Kappa oder vom Typ Lambda, nie beide. Der Lambda-Typ ist beim IgG des Menschen mit etwa 40% vertreten (Lexikon der Immunologie, 1992).

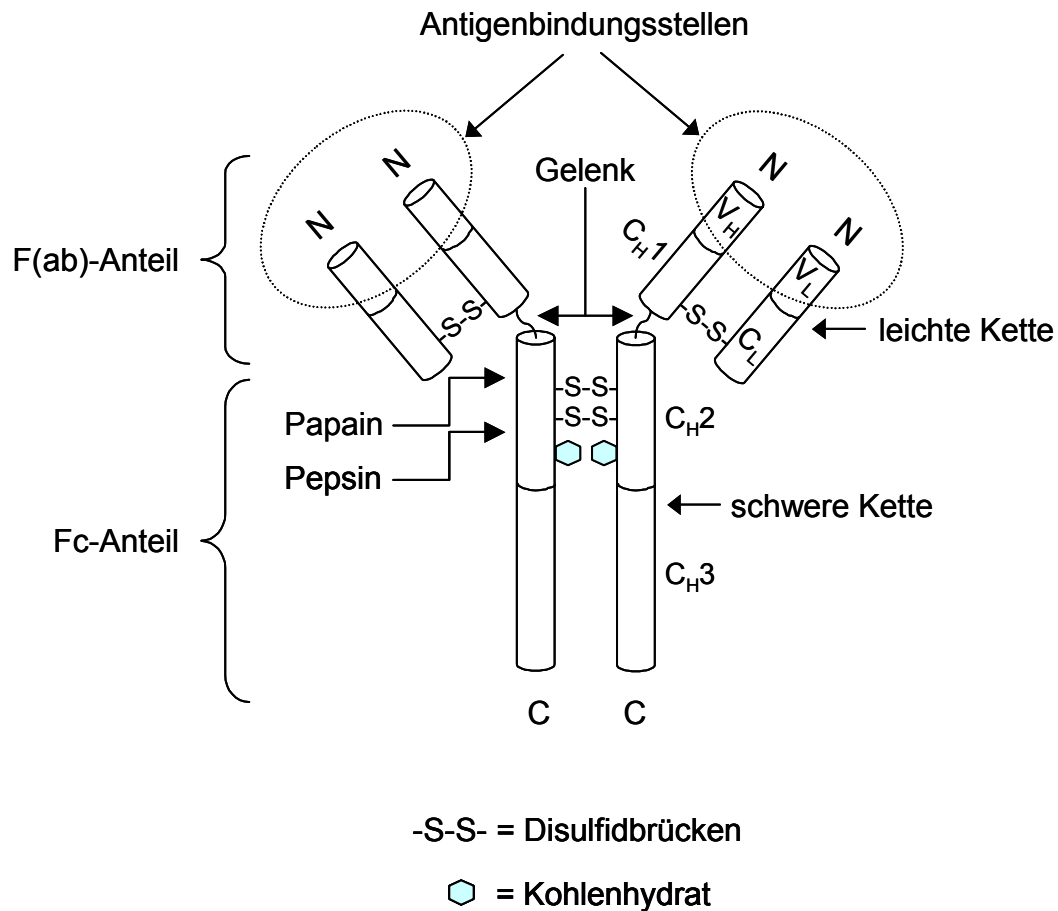


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Grundstruktur eines IgG-Moleküls. Die Antigenbindung erfolgt an die variablen Bereiche der schweren und leichten Polypeptidketten (gepunktete Kreise). Die schweren und leichten Ketten werden durch Disulfidbrücken (-S-S-) zusammengehalten. Nicht dargestellt sind die Disulfidbrücken innerhalb der H- und L-Ketten. Die Gelenkregion (Gelenk) des IgG-Moleküls ermöglicht eine flexible räumliche Anpassung an Antigenstrukturen. Die Winkelung zwischen den beiden F(ab)-Teilen kann bis zu 180° betragen. Eingezeichnet sind außerdem die Angriffsstellen der Proteasen Papain und Pepsin. Papain spaltet oberhalb der Disulfidbrücke, so dass zwei getrennte Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment entstehen. Dagegen bleiben bei der Behandlung mit Pepsin die beiden Fab-Fragmente über die Disulfidbrücken miteinander verbunden, welches als F(ab)₂-Fragment bezeichnet wird. Der Fc-Abschnitt wird durch Pepsin in mehrere kleinere Fragmente mit unterschiedlicher Größe gespalten.

2.3 Antikörpervielfalt

Nach Schätzungen ist der Organismus in der Lage ca. 10^{11} verschiedene Antikörperspezifitäten zu produzieren (JANEWAY, 1995). Diese Vielfalt wird auf DNA-Ebene durch Umlagerung und Rekombination von Gensegmenten (Genrearrangement) erzielt, die für die H- und L-Ketten der Immunglobuline codieren (TONEGAWA, 1983). Die Zahl der möglichen Kombinationen der Gensegmente ist u.a. durch die Anzahl vorhandener Gensegmente begrenzt. Durch weitere Prozesse wird die Diversität der möglichen Antikörperspezifitäten jedoch um ein Vielfaches erhöht. Beispielsweise durch unpräzise Verknüpfung der Gensegmente (Junktionale Diversität).

Struktur der Ig-Gene

Die variable Region der L-Ketten wird von zwei Gengruppen codiert, die als V (Variable)- und J (Joining)-Gene bezeichnet werden. Sie liegen durch nicht codierende DNA-Sequenzen (Introns) voneinander getrennt vor. Innerhalb jeder Gengruppe existiert eine unterschiedliche Anzahl von Gensegmenten. Die Zahl der J-Gensegmente beträgt beim Menschen 5, die exakte Anzahl der V-Gensegmente ist nicht bekannt, sie wird auf über 100 geschätzt. Jedem V-Gen ist zusätzlich eine L (Leader)-Sequenz vorangestellt. Dieses codiert für ein Signalpeptid, das die Polypeptidkette zu den Sekretionspfaden der Zelle führt. Für die C-Region der Kappa-L-Ketten codiert nur 1 Gensegment, während 6 C-Gene für die Lambda-L-Ketten codieren.

Im Unterschied zu den L-Ketten besitzen die Gene für die variable Region der H-Ketten zusätzlich D (Diversity)-Gensegmente ($n > 20$). Die C-Region der H-Ketten wird von mehreren C-Genen unterschiedlichen Isotyps (C_μ , C_γ , C_δ , C_ϵ , C_α) codiert, die in 3'-Richtung hinter den J_H -Gensegmenten liegen.

Die oben genannten Gensegmente sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Die Gensegmente der leichten Kappa-Ketten befinden sich auf Chromosom 2, die der leichten Lambda-Ketten auf Chromosom 22 und die der H-Ketten auf Chromosom 14 (ABBAS, 1994).

Expression der Ig-Gene

Ausgehend von einer Knochenmarkstammzelle durchlaufen B-Zellen verschiedene Entwicklungsphasen über frühe Pro-B-Zellen → späte Pro-B-Zellen → Prä-B-Zellen → unreife B-Zellen → bis hin zu reifen B-Zellen. Die ersten Verknüpfungen eines D_H -Segments mit einem J_H -Segment ereignen sich erst in den frühen Pro-B-Zellen, aus denen sich die späten Pro-B-Zellen entwickeln. In diesen wiederum wird ein V_H -Segment mit dem DJ_H -Segment verknüpft, wodurch eine Prä-B-Zelle entsteht, die nur wenige Oberflächen-, aber viele cytoplasmatische μ -H-Ketten exprimiert. Schließlich werden die Gene für die leichten Ketten umgeordnet. Die unreife B-Zelle exprimiert L- und μ -H-Ketten als Oberflächen-IgM-Moleküle.

Synthese der L-Ketten

Die Synthese leichter Kappa-Ketten in B-Zellen erfolgt auf DNA-Ebene zunächst durch eine Rekombination von V- und J-Genen (VJ-Rekombination). Danach erfolgt die Transkription von DNS auf eine Prä-mRNA. Diese enthält jedoch noch Introns, die durch Spleißen entfernt werden. Durch das RNA-Spleißen wird die verbundene VJ-Sequenz schließlich mit einem C-Gen verknüpft.

Synthese der H-Ketten

Ein erstes DNS-Rearrangement führt zur Verbindung je eines D- und J-Gens, darauf folgt die Verknüpfung der DJ-Segments mit einem V-Segment. Nach der Transkription erfolgt durch Spleißen, wie bei den L-Ketten, die Kopplung des VDJ-Segments mit einem C-Segment, das für die konstante Region der H-Kette codiert.

Die fertig synthetisierten L- und H-Ketten werden mittels oxidativer Verknüpfung von Cysteinresten durch Disulfidbrücken im Lamellenbereich des Endoplasmatischen Retikulums verbunden.

2.4 Immunglobulinklassen

Humane Immunglobuline lassen sich in die Klassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE einteilen. IgG lässt sich weiter in die Subklassen IgG1 bis IgG4 einteilen, wie auch IgA in zwei weitere Klassen (IgA1 und IgA2) eingeteilt wird. Normale Sera enthalten eine Mischung aus allen Klassen. Ca. 70% des Gesamt-IgG besteht aus IgG1, 18 % aus IgG2, 8% aus IgG3 und 3% aus IgG4 (JACOB, 1986).

2.5 Eigenschaften der IgG-Subklassen

Die IgG-Subklassen unterscheiden sich in ihren physikalischen und biologischen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Komplementaktivierung, der biologischen Halbwertszeit oder dem Bindungsverhalten gegenüber Protein A.

In Tabelle 2 sind die wichtigsten Eigenschaften humaner Ig zusammengefasst.

Tabelle 2 Eigenschaften humaner Immunglobulinisotypen
(zusammengestellt aus Immunologie, Janeway und Travers, 1995)

	Immunglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Molekulargewicht (kD)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serumspiegel in Erwachsenen (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,03	*
Komplementaktivierung	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-
Plasma-Halbwertszeit	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Bindung an Protein A	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Bindung an Phagozyten	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Plazentatransfer	+	+	+	+	-	-	-	-	-

* in Spuren

2.6 Historie intravenöser Immunglobuline

In den 40er Jahren wurde von COHN (1946) und Kollegen ein chemischer Prozess entwickelt, der es ermöglichte menschliches Plasma in seine wichtigsten Proteinkomponenten aufzutrennen (COHN, 1946; ONCLEY, 1949). Das Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um Albuminlösungen für den Blutersatz zu erzeugen. Später (1949) beschrieben Cohn und Mitarbeiter die erste Methode, um Immunglobuline aus den Fraktionen II und III in industriellen Maßstab zu isolieren. Dies ermöglichte die Gewinnung der ersten Immunglobulin-Konzentrate.

Zunächst wurden spezifische Immunglobuline hergestellt, die aus den Plasmen hyperimmunisierter Spender gewonnen wurden. Sie wurden für die Prophylaxe oder Behandlung von spezifischen Infektionen wie Hepatitis B, Polio, Tetanus und Pertussis produziert.

Die Applikation der Hyperimmunglobuline erfolgte intramuskulär. Mit dieser Applikationsroute waren jedoch Nachteile verbunden. Die Injektion erwies sich als schmerzhaft und die zu verabreichende Dosis war durch das Volumen und die Häufigkeit der Applikation limitiert. Weiter wurde als nachteilig empfunden, dass ein Teil des Immunglobulins bereits im Muskel durch Proteasen abgebaut wurde und der verbleibende Anteil die Zirkulation erst nach einiger Zeit erreichte, wodurch die Wirkung verzögert eintrat.

Die Versuche, solche Immunglobuline intravenös zu verabreichen, waren mit Risiken und Nebenwirkungen verbunden, die in extremen Fällen zum Tod führen konnten (HENSON und SPIEGELBERG, 1973). Solche Unverträglichkeiten wurden u.a. mit den beim Fraktionierungsprozess entstehenden IgG-Aggregaten begründet, die zu einer unspezifischen Aktivierung des Komplementsystems führen können (SGOURIS, 1967; SCHIFF, 1968).

2.7 Herstellung intravenöser Immunglobuline

Intravenöse Immunglobuline werden aus menschlichem Plasma durch Fällungs- und Aufkonzentrierungsverfahren gewonnen. Am verbreitetsten ist die Cohn'sche Fraktionierung oder Modifikationen dieser Methode. Das Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um Albumin durch schrittweise Erhöhung der Ethanolkonzentration in einer stabilen Lösung zu gewinnen. Die Fraktion II der ursprünglichen Cohn Methode wird durch Zusatz von 25% Ethanol gewonnen und enthält 95% bis 98% IgG. Die Kistler-Nitschmann Modifikation des Cohn'schen Verfahrens stellt eine vereinfachte Methode dar, die es erlaubt die beiden Hauptfraktionen mit weniger Zwischenschritten zu erhalten (KISTLER und NITSCHMANN, 1962). Die Präzipitation erfolgt auch hier auf Basis der Ethanolchemie.

Da mehr als 20% des IgGs in Form von Dimeren und Polymeren vorliegen können (YOUNG et al., 1978) wurden modifizierte Verfahren entwickelt, die eine Entfernung der Aggregate ermöglichen sollten. Die frühen Präparate wurden mit proteolytischen Enzymen (v.a. Pepsin, Trypsin) behandelt, um die Aggregate zu spalten (SGOURIS, 1967). Dies führte zu Präparationen, die intravenös verträglich waren, aber in vivo schneller katabolisiert wurden (BOSHKOV und KELTON, 1989). Die zweite Generation IVIG enthielt Verfahren, die die Produkte chemisch behandelten, um Aggregate zu entfernen. Dazu zählt die Behandlung mit β -Propiolacton (STEPHAN, 1980), die S-Sulfonierung (MASUHO et al., 1977) und die Reduktion und Alkylierung der Immunglobuline (FERNANDES und LUNDBLAD, 1980).

Die meisten der gegenwärtigen Herstellungsprozesse ermöglichen die Entfernung von IgG-Aggregaten, während IgG in nativer Form gewonnen wird. Dazu zählen Verfahren wie die Präzipitation mit Polyethylenglykol (MORELL, 1986), die Inkubation bei niedrigen pH-Werten (MC CUE, 1986) oder die Inkubation bei niedrigen pH-Werten unter Zusatz geringer Enzymmengen (MORELL, 1986). Weitere alternative Verfahren, wie die Ionen-Austauschchromatographie werden ebenfalls eingesetzt, um IVIG herzustellen. Zusätze in der Endformulierung, wie verschiedene Zucker, PEG oder Glycin erhöhen die Stabilität der Präparate.

2.8 Indikationen für IVIG

Der Einsatz von Immunglobulinen lässt sich grundsätzlich aus den wichtigsten biologischen Funktionen der Antikörper ableiten. Die in den Präparaten enthaltenen Antikörper wirken durch die Neutralisation von Viren, Bakterien und deren Toxine, sie steigern die Phagozytose und aktivieren das Komplementsystem. Die Gabe von Immunglobulinen verleiht dem Empfänger einen zeitlich begrenzten Schutz vor Infektionskrankheiten. Immunglobuline werden bei allen Zuständen eingesetzt, die entweder durch einen Verlust oder aber eine Synthesestörung der Antikörper bedingt sind (NACHBAUER et al., 1997; NAGENDRA, 1998).

2.8.1 Anerkannte Indikationen

Als anerkannte Indikationen für die prophylaktische und therapeutische Gabe gelten die Substitutionsbehandlung bei nachgewiesenen Störungen der Antikörperbildung und die Modulation des humoralen Immunsystems mittels Gabe von IVIG (Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten, 1995; CPMP, 2000).

Die nachfolgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die zur Zeit anerkannten Indikationen:

Substitution bei primären Immundefekterkrankungen

Zu den primären Immundefiziterkrankungen werden gezählt:

- Agamma- und Hypogammaglobulinämie
- variable und schwere kombinierte Immundefektsyndrome
- das Wiskott-Aldrich-Syndrom

Substitution bei sekundären Immundefekterkrankungen

Die Substitution wird zum Schutz vor Infektionen angewandt bei:

- Myelomen und chronisch lymphatischer Leukämie
- schwerer sekundärer Hypogammaglobulinämie

Immunmodulation

Bei Vorliegen einer Idiopathischen Thrombocytopenischen Purpura (ITP) werden IVIG bei Kindern und Erwachsenen zur Korrektur der Thrombozytenzahlen bei hohem Blutungsrisiko oder vor chirurgischen Eingriffen angewandt. Weitere Indikationen für IVIG sind das Guillain-Barre´ Syndrom und das Kawasaki Syndrom.

Allogene Knochenmarkstransplantation

IVIG werden hier zur Infektionsprophylaxe und Prophylaxe der Graft-versus-host-disease (GvHD) eingesetzt.

2.8.2 Nicht gesicherte Indikationen

Außer in den anerkannten Indikationen werden IVIG zur Behandlung oder Beeinflussung bei einer Reihe weiterer Krankheitsbilder angewandt, deren klinischer Nutzen zur Zeit nicht eindeutig belegt ist. Die folgende Übersicht führt die häufigsten Krankheitsbilder auf (zusammengestellt aus: Intravenous Immunoglobulins in Clinical Practice, 1997):

- Neutropenie
- Hämolytische Anämie
- Juvenile rheumatoide Arthritis
- Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
- Myasthenia Gravis
- Multiple Sklerose
- Polymyositis
- Dermatomyositis
- Lupus Erythematosus

2.9 Virussicherheit von Blutprodukten

Einige Vorfälle in den letzten 20 Jahre zeigten, dass durch menschliches Blut lebensbedrohende virale Infektionskrankheiten auf Patienten übertragen werden können, die sich einer Plasmaprotein-Therapie unterzogen. 1981 wurde die medizinische Welt mit AIDS konfrontiert (CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1981). Gegen Ende 1982 wurde klar, dass das Virus durch Blut und Plasma-produkte übertragen werden konnte (HIRSCH und CURRAN, 1996). Während dieser Zeit wurden viele Hämophiliepatienten, die Faktor VIII-Präparate erhielten, mit dem HIV-Virus infiziert. Fast alle Hämophiliepatienten, die mit HIV infiziert wurden, starben. Die Vorfälle führten zu einer Änderung bei der Produktion von Plasmaproteinen, vorzugsweise von Faktor VIII-Präparaten.

Vereinzelte Berichte über HBV- und NANB-Hepatitisvirus-Übertragungen durch Immunglobuline wurden 1979 und in den frühen 80iger Jahren veröffentlicht (TABOR, 1979; LANE, 1983; LEVER, 1984). Im Jahre 1992 wurde mehrmals über die Übertragung von Hepatitis A Virus (HAV) durch Faktor VIII-Präparate berichtet (MANUCCI, 1992; GERRITZEN, 1992; TEMPERLY, 1992).

1994 wurde über die Übertragung von Hepatitis C durch ein kommerzielles intravenöses Immunglobulin berichtet, dass daraufhin vom Markt genommen wurde (BJØRO, 1994; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1994).

In jüngster Zeit sind weitere Infektionserreger aufgetreten, die ein potentielles Risiko für Patienten darstellen, die auf Plasmaproteingaben angewiesen sind. Beispielsweise das Parvovirus B19, das Hepatitis G Virus (HGV) oder auch Prionen, die die Creutzfeldt-Jacob Disease (CJD), bzw. die neue Variante der Creutzfeldt-Jacob Disease (vCJD) verursachen können.

Um das Restrisiko einer Virusübertragung zu minimieren wurden zusätzliche Anforderungen an die Herstellungsverfahren von Plasmaprotein-Präparaten gestellt. Die wichtigsten Ziele waren: 1. Reduktion oder Eliminierung der die Plasmapools kontaminierenden Erreger und 2. die Sicherstellung, dass es bei einer zufälligen Kontamination des Plasmapools durch einen Spender mit unerkannter Infektion nicht zu einer Übertragung der Infektionserreger auf den Patienten kommt.

2.10 Virusinaktivierungsverfahren

Es wurden verschiedene Virusinaktivierungsverfahren entwickelt, die zur Zeit bei der Herstellung von therapeutischen Plasmaproteinen angewendet werden. Einige Produktionsschritte, die ursprünglich für andere Zwecke eingeführt worden waren, erwiesen sich ebenfalls als virusinaktivierend bzw. viruseliminierend. Die Tabelle 3 führt die gebräuchlichsten Verfahren zur Virusinaktivierung auf.

Tabelle 3 Verfahren zur Inaktivierung oder Eliminierung von Viren bei der Herstellung von Immunglobulin-Präparaten.

<i>Spezielle Verfahren zur Virusinaktivierung</i>	
Verfahren	Bedingungen und verwendete Substanzen
Hitze (flüssig)	60°C, 10 Std
Solvens/Detergenz	TNBP-Tween 80 und/oder Triton X-100
Nanofiltration	div. Porengrößen im Nanometerbereich
<i>Ursprünglich für andere Zwecke konzipierte Verfahren</i>	
β-Propiolacton	23°C, 5 Std
Pepsin	pH 4,35, 37°C, 16-22 Std
pH 4-Inkubation	24-72 Std, 27° C, 45°C
Flüssiglagerung von IVG	pH 4,25, 20-21°C, 21 Tage
PEG-Präzipitation	4-6% PEG, 0-4°C
DEAE Sephadex	pH 7,5-8,0
Caprylsäure-Präzipitation	als Ersatz für die Kälte-Ethanol-Fraktionierung
S-Sulfonierung	pH 5, 5°C, 10 Std

2.10.1 Hitzebehandlung

Das erste Verfahren, dass speziell entwickelt wurde um Viren in Plasmaprotein-Fractionen zu inaktivieren, war die Erhitzung von Albumin für 10 Stunden bei 60°C (PENNEL, 1957). Dieses Verfahren eignete sich für stabilisierte Albuminlösungen, andere hitzeempfindliche Proteine wurden durch das Erhitzen jedoch schnell inaktiviert (DIXON, 1964).

Obwohl die Hitzebehandlung in vielerlei Hinsicht unbefriedigend war, wurde sie bei der Produktion von Faktor VIII-Präparaten angewandt. Ursprünglich wurde die Hitzebehandlung an getrockneten Präparaten durchgeführt, um eine Virusinaktivierung ohne Zerstörung der biologischen Aktivität der Faktor VIII-Präparate zu erreichen. Beim Versuch, Faktor VIII in den Endbehältnissen mit Hitze zu behandeln (Terminal Dry Heat), wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Obwohl HIV-1 durch Erhitzen für 10 Stunden bei 60°C inaktiviert werden konnte, wurde das NANB-Hepatitis Virus nicht inaktiviert (HOLLINGER et al., 1984). Hersteller, die Temperaturen bis 80°C für 72 Stunden anwandten, erzielten einen höheren Grad an Virusinaktivierung (COLVIN et al., 1988). Trotzdem waren die Ergebnisse bei Benutzung der Terminal Dry Heat Methode insgesamt uneinheitlich, da sich der Grad der Virusinaktivierung von der Restfeuchte des Produktes abhängig zeigte und diese von Lot zu Lot variierte (SUOMELA, 1993). Darüber hinaus verschlechterte sich das Lösungsverhalten der erhitzten Faktor VIII-Präparate neben Verlusten der biologischen Aktivität.

2.10.2 Solvens/Detergenz (S/D)-Behandlung

1988 berichtete HOROWITZ über vorläufige Daten, die erkennen ließen, dass sich das zur Virusinaktivierung bei Faktor VIII-Präparaten angewandte S/D-Verfahren ebenfalls als effektiv bei der Inaktivierung von Viren in Immunglobulin-Lösungen erwies. Mittlerweile ist das S/D-Verfahren die am häufigsten angewandte Virusinaktivierungsmethode bei Immunglobulinen.

Der S/D-Virusinaktivierungsprozess wurde vom New York Blood Center entwickelt und 1985 von der amerikanischen Food and Drug Association (FDA) für die Herstellung von Faktor VIII-Präparaten zugelassen (HOROWITZ, 1994). Inzwischen wird das S/D-Verfahren bei einer ganzen Reihe von verschiedenen Produkten und Präparaten angewandt. Ein Grund für die weitläufige Akzeptanz des S/D-Verfahrens besteht in der leichten Durchführbarkeit des Verfahrens und seiner gut dokumentierten virusinaktivierenden Wirkung bei verschiedenen Blutderivaten. Die Tabelle 4 fasst die Virusinaktivierungsfähigkeiten des Lösungsmittels TNBP und verschiedener Lösungsvermittler (Detergenzien) zusammen.

Die S/D-Behandlung inaktiviert behüllte Viren durch zwei Mechanismen:

1. durch die Zerstörung der Virus-Lipidhülle und
2. durch die Inaktivierung des Nukleokapsids.

Tabelle 4 Virusinaktivierung durch TNBP/Detergenz (aus: Viral safety of solvent-detergent treated blood products; HOROWITZ, 1993)

Virus	Inaktivierung (log ₁₀)
Vesikuläres Stomatitis Virus	≥ 9,2
Sindbis Virus	≥ 8,8
Sendai Virus	≥ 6,0
HBV	≥ 6,0
HCV	≥ 5,0
HIV Typ 1	≥ 11,0
HIV Typ 2	≥ 6,0
Enten HBV	≥ 7,3
Cytomegalovirus	≥ 6,0
Herpes Simplex Virus Typ 1	≥ 5,8
Venezuela Pferde Encephalitis Virus	≥ 6,0
Parainfluenza 3	≥ 4,0
Murines Leukämie Virus	≥ 6,0
Murines Xenotropisches Virus	≥ 4,0

2.10.3 Nanofiltration

Eine weitere Möglichkeit, die Virussicherheit zu erhöhen, besteht in der Eliminierung der Viren durch Filtrationsschritte. Dazu werden spezielle Filter mit sehr kleiner Porengröße (Nanofilter) verwendet. Die Porengrößen betragen 15, 35, 50 und 75 nm. Virusreliationsdaten haben gezeigt, dass 15 und 35 nm Filter Viren aus Plasmaproteinlösungen mit niedrigem Proteingehalt zwischen 0,4 und 1 mg/ml entfernen können (HOROWITZ, 1994). Der 15 nm Filter war in der Lage, die unbehüllten Modellviren Poliovirus Sabin Typ1 (25-30 nm) und das Bovine Parvovirus (20-25 nm) aus Lösungen von Faktor IX und Faktor XI zu entfernen (HOROWITZ, 1994). Der 35 nm Filter entfernte HIV-1 (80-100 nm), BVDV (60-70 nm), Reovirus Typ 3 (60-80nm), Bovines Parvovirus (20-25 nm), SV 40 (45 nm) und das Pseudorabies Virus (120-200 nm) aus Faktor IX oder Faktor XI Lösungen (HOROWITZ, 1994).

Obwohl das Bovine Parvovirus (20-25 nm) einen kleineren Durchmesser als die Porenweite (35 nm) besaß, wurde es zurückgehalten. Die Autoren erklärten, dass das Bovine Parvovirus zur Aggregatbildung neigt und deshalb durch den 35 nm Filter entfernt wird (HOROWITZ, 1994).

Inzwischen wird die Nanofiltration auch bei der Herstellung von IVIG von einigen Firmen angewandt. Eine Herausforderung für die Filter stellen besonders kleine unbehüllte Viren, wie das Parvovirus B19 (18-24 nm) und das Hepatitis A Virus (27-32 nm) dar. Andere für die Virusfiltration interessante Viren sind HCV Core Partikel (30-38 nm), HCV (55-65 nm) und HBV (40-45 nm).

2.10.4 Andere Herstellungsschritte mit Virusinaktivierungspotential

1962 vermutete man, dass die Komplementaktivierung (antikomplementäre Aktivität) durch Immunglobulinlösungen eine primäre Ursache für das Auftreten von Nebenwirkungen war, die auftreten konnten, wenn man Immunglobuline, die nach der Kälte-Ethanol-Fraktionierungsmethode hergestellt wurden, intravenös applizierte (HOOPER, 1988). Diese Beobachtung führte zur Entwicklung einer Reihe von kommerziellen Immunglobulin-Präparaten, die mit Enzymen oder reaktiven Chemikalien behandelt wurden, um die antikomplementäre Reaktion zu verhindern (HOOPER, 1988).

Später wurde festgestellt, dass einige dieser Verfahren auch virusinaktivierende Wirkungen besaßen. Die Inkubation von Immunglobulinen bei niedrigen pH-Werten (pH 4) wird von einigen Unternehmen angewandt und minimiert erfolgreich die antikomplementäre Aktivität (HOOPER, 1988). In späteren Experimenten wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Pepsin bei pH 4 auch verschiedene behüllte Viren inaktiviert (REED, 1988; KEMPF, 1991). MITRA et al. (1986) berichtete über den Verlust der HIV-1 Infektiosität von IVIG-Lösungen, wenn diese bei pH 4,25 oder pH 6,8 für 1-3 Tage bei 27°C oder 45°C gelagert wurden. Die Autoren berichteten außerdem, dass Maus Typ C Retroviren drei Stunden nach Zusatz in eine IVIG-Lösung bei pH 4 nicht mehr nachzuweisen waren. In einer folgenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Infektiosität von HCV und BVDV aus einer flüssigen IVIG-Präparation verliert, wenn diese bei pH 4,25 für 21 Tage bei 21°C inkubiert wurde (LOUIE, 1994).

Die Behandlung mit β -Propiolacton oder die Sulfonierung wurde ebenfalls entwickelt, um die antikomplementäre Aktivität zu eliminieren (STEPHAN, 1975; MASUHO, 1977). Später wurden beide Verfahren als virusreduzierend validiert. Studien an Faktor VIII- und IVIG-Präparaten, die mit β -Propiolacton behandelt wurden haben gezeigt, dass β -Propiolacton HBV, HIV und HCV inaktiviert (PRINCE, 1983 und 1985, STEPHAN, 1988).

Auch das ursprünglich zur Vermeidung von Unverträglichkeiten entwickelte Verfahren der S-Sulfonierung besitzt virusinaktivierendes Potential. Nach NOWAK (1992) werden das HIV, HSV, Polio-Virus, Bovine Virus Diarrhoe Virus (BVDV), Tick Borne Encephalitis Virus (TBE) und das Gelbfiebertvirus inaktiviert.

Als nachteilig wird jedoch beschrieben, dass die chemische Modifizierung mit biologischen Aktivitätsverlusten der Immunglobuline verbunden ist. So wurde über eine Reduktion der bakteriellen Opsonisierungsfähigkeit (POLLACK, 1983; BENDER, 1987), der Virus-Neutralisation (CHEHIMI, 1987) und der biologischen Halbwertszeit bei chemisch modifizierten IVIG berichtet (JANEWAY, 1968; WINSTON, 1982; HAGENBEEK, 1987).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Immunglobulin-Präparate

Bei den untersuchten Immunglobulin-Präparaten handelte es sich um Prüfmuster oder Zulassungsproben, die zur Freigabe oder Zulassung beim Paul-Ehrlich-Institut von den Herstellern eingereicht wurden. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit wurden die Immunglobulin-Präparate in zwei Gruppen eingeteilt:

A) modifizierte IVIG: Immunglobulin-Präparate, die im Laufe ihres Herstellungsprozesses chemisch oder enzymatisch behandelt wurden.

B) nicht modifizierte IVIG: Immunglobulin-Präparate, deren Herstellungsprozess keine chemischen oder enzymatischen Behandlungsschritte enthält.

Die Handelsnamen der IVIG-Präparate werden nicht genannt, um etwaige rechtliche Konsequenzen zu vermeiden. Stattdessen wurden die verschiedenen Präparate mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Bei den in den folgenden Tabellen grau unterlegten IVIG-Präparaten mit identischen Buchstaben handelt es sich um Präparatepaare, an denen der Einfluss der zusätzlichen Virusinaktivierung vergleichend untersucht werden konnte. Das virusinaktivierte Nachfolgeprodukt ist jeweils durch ein dem Buchstaben nachgestelltes „+“-Zeichen kenntlich gemacht. In den Tabellen 5 und 6 sind die untersuchten Präparate und ggf. die verwendete Virusinaktivierungsmethode sowie die Art der Modifikation zusammengestellt.

Tabelle 5 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Präparat	(zusätzliche) Virusinaktivierung	Art der Modifikation
A	-	Trypsin/Chymotrypsin
A+	Solvens/Detergenz	Trypsin/Chymotrypsin
B	Hitze (60°C, 10h)	Pepsin
C	-	β-Propiolacton
C+	Nanofiltration	β-Propiolacton
D	-	Pepsin, pH4
E	-	S-Sulfonierung
E+	Fettalkohole	S-Sulfonierung
F	-	β-Propiolacton

Tabelle 6 Nicht modifizierte IVIG

Präparat	(zusätzliche) Virusinaktivierung	Art der Modifikation
G	Hitze (60°C, 10 h)	-
H	-	-
H+	Solvens/Detergenz	-
I	Solvens/Detergenz	-
J	Hitze (60°C, 10 h)	-
K	Solvens/Detergenz	-
L	Solvens/Detergenz, pH 4	-
M	-	-
M+	Solvens/Detergenz, pH 4,25	-

Die IVIG-Präparate enthalten überwiegend Antikörper der Klasse IgG. Albumin kann in unterschiedlichen Konzentrationen als Stabilisator zugesetzt werden. Die Zusammensetzung, die Art der Herstellung (Fraktionierungsmethode) und die zugesetzten Stabilisatoren gehen aus Tabelle 7 und Tabelle 8 hervor.

Einige Präparate werden als Lyophilisat, andere als Flüssigzubereitung angeboten. Um zwischen den Experimenten lagerungsbedingte Veränderungen an den Präparaten zu minimieren, wurden unter sterilen Bedingungen mehrere 1 ml Aliquots aus den Originalbehältnissen entnommen und in sterilisierten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bis zum Versuchsbeginn bei –20°C gelagert. Präparate, die in lyophilisierter Form vorlagen wurden zuvor mit dem zugehörigen Lösungsmittel nach Herstelleranweisung rekonstituiert und unter gleichen Bedingungen gelagert.

3.1.2 Plasmapoolproben

Zur Herstellung von Immunglobulin-Präparaten werden Einzelplasmen zu einem Plasmapool vereinigt. Die Herstellung einer einzigen Charge IVIG erfolgt aus einem großen oder aber mehreren kleinen Plasmapools. Proben dieser Pools werden im Paul-Ehrlich-Institut routinemäßig auf bestimmte virale Marker untersucht. Für die eigenen Untersuchungen wurden – soweit noch vorhanden – Rückstellproben dieser Plasmapools verwendet und den IVIG-Chargen zugeordnet. Die Lagerung der Plasmapoolproben erfolgte bei –20°C bis –80°C.

Tabelle 7 Modifizierte Immunglobulin-Präparate (Herstellerangaben)

Präparat	Herstellung	Protein-Gehalt/ Zusammensetzung	Stabilisatoren/ Zusätze
A	Kälte-Ethanol-Verfahren (modifiziert)	50 mg/ml intaktes Ig in 55-65 mg/ml Gesamt Ig	Glukose 50 mg/ml PEG 4000 ≤ 5 mg
A+	Kälte-Ethanol-Verfahren (modifiziert)	50 mg/ml intaktes Ig in 55-65 mg/ml Gesamt Ig	Glukose 50 mg/ml PEG 4000 ≤ 5 mg
B	Cohn (modifiziert)	50 mg/ml	Glycin 22,5 - 27,5 mg/ml
C	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml	Glukose 27,5 mg/ml
C+	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml davon ≥ 95% Ig	Glukose 27,5 mg/ml
D	Kistler-Nitschmann pH 4	30 oder 60 mg/ml Ig > 95% Ig	Saccharose 50/100 mg/ml Albumin max. 3%
E	Cohn	50 mg/ml Ig 80% IgG 12% IgA 8% IgM	Glycin 22,5 - 27,5 mg/ml
E+	Cohn	50 mg/ml Ig 80% IgG 12% IgA 8% IgM	Glycin 22,5 - 27,5 mg/ml
F	Cohn	50 mg/ml > 95% Ig IgG 38 mg/ml IgM 6 mg/ml IgA 6 mg/ml	Glukose 27,5 mg/ml

Tabelle 8 Nicht modifizierte Immunglobulin-Präparate (Herstellerangaben)

Präparat	Herstellung	Protein-Gehalt/ Zusammensetzung	Stabilisatoren/ Zusätze
G	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml Ig	D-Sorbitol 50 mg/ml
H	Cohn	50 mg/ml > 90% IgG	Albumin 3 mg/ml Glukose 21,7 mg/ml Glycin 22,5 mg/ml
H+	Cohn	50 mg/ml > 90% IgG	Albumin 3 mg/ml Glukose 21,7 mg/ml Glycin 22,5 mg/ml
I	Cohn	100 mg/ml Gesamtprotein davon 50% Ig > 95% IgG	Albumin 50 mg/ml Glukose 24 mg/ml Glycin 4 mg/ml
J	Caprylsäure-fällung PEG-Präzipitation	45,5 mg/ml Ig	Albumin 15 mg/ml Saccharose 45,5 mg/ml
K	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml davon $\geq 95\%$ Ig	Glycin 22,5 mg/ml
L	Cohn-Onoley, Ethanol-fällung	50 mg/ml IgG	Maltose 100 mg/ml
M	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml > 98% IgG	Maltose 100 mg/ml
M+	Kälte-Ethanol-Verfahren	50 mg/ml > 98% IgG	Maltose 100 mg/ml

3.2 Analyse der Proteinzusammensetzung

3.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Immunglobuline wurden zur Charakterisierung der Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, Proteingemische alleine aufgrund ihrer Molekülgröße zu trennen (LAEMMLI, 1970). Hierzu wird das Proteingemisch zunächst durch Aufkochen denaturiert. Dieser Vorgang wird durch Inkubation mit Natrium-Dodecylsulfat (Sodium Dodecylsulphate = SDS) unterstützt, wobei sich die negativ geladenen SDS-Moleküle gleichmäßig an das gesamte Protein anlagern. Durch die Abstoßung der negativen Ladungen wird das Protein entfaltet und gestreckt: Es liegt somit in einer fadenförmigen Form vor. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im porösen Gel ist daher – nach Anlegung eines elektrischen Feldes – allein von der Molekülgröße abhängig.

Die Behandlung der Antikörper in einem Probenpuffer, der reduzierende Substanzen wie Dithiothreitol oder Mercaptoethanol enthält, führt zur Spaltung der Disulfidbrücken, die die H- und L-Ketten im Antikörpermolekül verbinden.

3.2.1.1 Herstellung der Gele

Die zur Durchführung der SDS-PAGE verwendeten Lösungen und Reagenzien sind unter 3.2.1.4 aufgeführt. Die Zusammensetzung der Gele ist aus Tabelle 9 ersichtlich.

Zunächst wurden pro anzufertigendem Gel 3 ml Trenngel zwischen die durch Abstandshalter (0,75 mm) getrennten Glasplatten (7,3 cm x 8,3 cm) gegossen und zum Schutz vor Sauerstoff mit 1 ml 2-Propanol überschichtet. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war (ca. 30 – 45 min), wurde der Alkohol entfernt und anschließend das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Danach wurden die Kämme in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt und gewartet, bis auch das Sammelgel auspolymerisiert war. Nach Entfernen der Kämme wurden die Platten in das Gelelektrophoresesystem (Mini-Protean II, BioRad) eingesetzt und der obere und untere Puffertank mit Elektrodenpuffer gefüllt.

Vor dem Auftrag der Proben wurden die Taschen mit Elektrodenpuffer unter Zuhilfenahme einer Injektionskanüle gespült, um nicht auspolymerisierte Gelreste zu entfernen.

3.2.1.2 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden mit reduzierendem, bzw. nicht reduzierendem Probenpuffer auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml Proteingehalt verdünnt. Die vorverdünnten Proben wurden 5 min bei 90°C aufgekocht und anschließend 30 Sekunden bei max. Drehzahl (17860 x g) abzentrifugiert. Pro Geltasche wurden 10 µl (5 µg) der so behandelten Proben mittels Einmalpipettenspitzen (GELoader Tips, Eppendorf) aufgetragen.

Nach dem Auftragen der Proben und Größen-Marker (LMW Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia Biotech) wurde die Elektrophorese durch Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V gestartet. Die Elektrophorese wurde mit Erreichen der blauen Laufront am unteren Gelende beendet (ca. 1 Stunde).

3.2.1.3 Coomassiefärbung der Gele

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele zunächst für 30 min in Fixierlösung fixiert und anschließend in Kunststoffschalen unter ständigem Schwenken über Nacht in Coomassie-Lösung gefärbt.

Am nächsten Tag wurden die Gele mittels 20%iger Methanollösung entfärbt und anschließend für 30 min mit Vorbereitungslösung behandelt. Die Vorbereitungslösung enthielt Glycerin, das ein Austrocknen und Einreißen der Gele während der Trocknung verhindern soll. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Gele zwischen zwei (in Vorbereitungslösung eingeweichte) Cellophanfolien gelegt und diese in einen Gel Trocknungsrahmen (Serva Gel-Drying Kit Mini, SERVA) zum Trocknen eingespannt. Die Dokumentation erfolgte durch Einscannen der Gele auf einem Scanner (UMAX Astra 1200 S).

3.2.1.4 Lösungen und Rezepturen für die SDS-PAGE

Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)

Ammoniumpersulfat p.a.		1,0 g
Aqua dest.	ad	10 ml

Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan p.a.		181,7 g
Aqua dest.	ad	1000 ml

pH-Wert mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

Sammelgelpuffer (1,0 M Tris/HCl pH 6,8)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan p.a.		12,1 g
Aqua dest.	ad	100 ml

pH-Wert mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

SDS-Lösung (10%)

Dodecylsulfat Natriumsalz		10 g
Aqua dest.	ad	100 ml

1 x filtriert (Faltenfilter)

Elektrodenpuffer-Stammlösung (10 x)

Tris		30 g
Glycin p.a.		144 g
Aqua dest.	ad	800 ml

1 x filtriert (0,2 µm Nylonfilter)

SDS-Lösung (10%)		100 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

Elektrodenpuffer (Gebrauchslösung)

Elektrodenpuffer-Stammlösung		100 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

Nicht-reduzierender Probenpuffer

Sammelgelpuffer		2,5 ml
Bromphenolblau		5,0 mg
SDS		1,0 g
Glycerin		6,3 g
Aqua dest.	ad	100,0 ml

Reduzierender Probenpuffer

1,4-Dithiothreitol (DTT)		0,1 g
Nicht-reduzierender Probenpuffer	ad	10,0 ml

Färbelösung

Brilliant Blue G		200 ml
Colloidal Concentrate		
Aqua dest.	ad	1000 ml

Colloidal-Blue-G Lösung

Colloidal-Blue-G		80 ml
Färbelösung		
Methanol	ad	100 ml

Fixierlösung

Ethanol		500 ml
Essigsäure		100 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

Methanol-Lösung 20%

Methanol		200 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

Vorbereitungslösung

Ethanol		20 ml
Glycerin		10 ml
Aqua dest.	ad	100 ml

Tabelle 9 Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele
(Volumenangaben gelten für die Herstellung von 2 Gelen)

Stammlösung	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (4,5%)
Acrylamid : N,N-Methylenbisacrylamid (29,1: 0,9)	3125 µl	750 µl
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1875 µl	---
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	---	625 µl
Aqua dest.	2425 µl	3300 µl
Orange G-Lösung	---	200 µl
SDS (10%)	75 µl	50 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	4 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)	50 µl	15 µl

3.2.2 Immunoblotting (Western Blot)

Zur Identifizierung der in der SDS-PAGE erhaltenen Banden wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Darstellung des Gesamtproteins erfolgte durch Anfärbung mit Ponceaurot (Sigma). Nach dem Einscannen der Membran wurde mittels TBS entfärbt und anschließend freie Bindungsstellen mittels 5% BSA-Lösung über Nacht bei 4°C blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges Waschen in TBS/Tween 0,05% entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einer Anti-human IgG/Peroxidasekonjugat-Lösung (1:4000) überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen in TBS/Tween 0,05% entfernt. Die Visualisierung gebundener Antikörperkonjugate erfolgte durch Inkubation (5 min, RT) der Blotmembran mit chemilumineszierendem Substrat (SuperSignal, Pierce, USA) und anschließender Belichtung eines Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham Life Science).

3.2.2.1 Ablösen des Anti-IgG/Peroxidasekonjugates (Strippen)

Um die gleiche Nitrozellulosemembran für eine weitere Inkubation mit einem Antikörper anderer Spezifität vorzubereiten, wurde das Anti-human IgG/Peroxidasekonjugat durch Inkubation (Wasserbad, 56°C, 30 min) in einer Stripping-Lösung entfernt. Anschließend wurde die Membran in TBS/Tween gewaschen und erneut, wie oben beschrieben, mit 5%iger BSA-Lösung blockiert.

3.2.2.2 Anti L-Ketten Immunoblot

Die Detektion der L-Ketten erfolgte durch Inkubation der oben vorbereiteten Blotmembran mit einem 1:2000 in TBS/Tween verdünnten Ziege Anti-human Lambda Light Chain-Antikörper/Peroxidasekonjugat (A-5175, Sigma). Die weitere Durchführung erfolgte wie unter Immunoblotting beschrieben.

3.2.2.3 Immunoblotting: Puffer und Lösungen

Die 10x TBS-Lösung wurde vom Lösungsmittellabor des Paul-Ehrlich-Institutes bereitgestellt und zum Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Die Lösung hatten folgende Zusammensetzung:

1 M TBS (10x), pH 8,0

Tris		121,14 g
NaCl		876,60 g
Aqua dest.	ad	1000 ml
mit HCl auf pH 8,0 eingestellt		

TBS/Tween 0,05%

TBS 1x		999,5 ml
Tween 20	+	0,5 ml

3.2.3 IgG-Subklassenbestimmung

Die IgG Subklassenzusammensetzung der Präparate wurde mittels einfacher radialer Immundiffusion bestimmt. Dazu wurde ein kommerzielles Testkit (Human IgG Subclass Combi Kit, Code RK 021, The Binding Site GmbH, Heidelberg) verwendet. Jedes Testkit bestand aus vier Fertiggelel mit vorgestanzten Auftragsstellen für die Proben bzw. Kontrollen. Die Gele enthielten, nach Platten getrennt, monoklonale Antikörper gegen die humanen IgG-Subklassen 1 bis 4.

Nach dem Probenauftrag diffundieren die in der Probe enthaltenen Antikörper aus der Vertiefung radial in das Gel. In der Äquivalenzzone kommt es zu einer sichtbaren Präzipitation der entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe. Der Durchmesser des entstandenen Präzipitattringes ist bei vorgegebener Antigenmenge (= mAk) von der Antikörperkonzentration der Probe abhängig (MANCINI, 1965).

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden im mitgelieferten Verdünnungsmittel (7%ige BSA-Lösung) zunächst auf einen IgG-Gehalt von ca. 10 mg/ml eingestellt. Entsprechend der Herstelleranweisung wurde für die Bestimmung der Subklassen IgG1 und IgG2 eine weitere Verdünnung 1:10 in BSA vorgenommen, während für die Bestimmung der Subklassen IgG3 und IgG4 keine weitere Verdünnung vorgenommen werden musste.

Zur Erstellung einer Kalibrationskurve wurde der mitgelieferte Kalibrator auf drei verschiedene Konzentrationen (100%, 60%, 10%) eingestellt. Zur Kontrolle der Testgültigkeit wurde ein Kontrollserum des Testkits mit deklariertem Antikörpergehalt für jede IgG-Subklasse mitgeführt.

3.2.3.2 Durchführung

Je 5 µl der vorbereiteten Proben und Kalibratoren wurden in die ausgestanzten Vertiefungen der Gele pipettiert, die Platten abgedeckt und für mindestens 72 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.2.3.3 Auswertung

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Durchmesser der ausgebildeten Präzipitatringe mittels einer Vergrößerungsoptik mit integrierter, digitaler Längenmessung (Immuno-Viewer, Immuno Diagnostika, Heidelberg) auf 1/10 mm genau bestimmt. Aus dem Quadrat der Ringdurchmesser und der bekannten Konzentration des mitgeführten Kalibrators wurde in Excel (Microsoft) eine Regressionsgerade erstellt und der IgG-Subklassengehalt der IVIG-Proben an dieser bestimmt.

3.3 Bestimmung spezifischer Antikörpergehalte in IVIG

3.3.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine serologische Methode, die den spezifischen und empfindlichen Nachweis von Antikörpern oder Antigenen mit Hilfe von enzymmarkierten Reaktionspartnern des entstehenden Antigen-Antikörperkomplexes erlaubt. Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA für den Antikörpernachweis arbeiten entweder nach dem indirekten oder dem kompetitiven Prinzip.

3.3.1.1 Indirekter ELISA zum Nachweis von Antikörpern

Zum Nachweis spezifischer Antikörper wird gereinigtes Antigen chemisch an eine feste Phase gebunden (z.B. 96-Loch Polystyrol-Mikrotitrationsplatte). Freie Bindungsstellen werden z.B. durch BSA blockiert. Anschließend lässt man die auf Antikörper zu untersuchende Probe mit dem Antigen reagieren. Enthält die Probe spezifische Antikörper, binden diese an das immobilisierte Antigen. Überschüssige und unspezifische Antikörper werden durch Waschschriffe entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch die Zugabe enzymmarkierter Antikörper, die gegen Antikörper gerichtet sind. Nach einem weiteren Waschschriffe erfolgt die Zugabe eines zunächst farblosen Substrates (z.B. TMB, OPD), das enzymatisch in ein farbiges Produkt gespalten wird. Die Substratumsetzung wird gestoppt, indem die Enzymaktivität durch die Zugabe einer Säure beendet wird. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional der Anzahl der gebundenen, enzymmarkierten Antikörper und lässt sich photometrisch bestimmen.

3.3.1.2 Kompetitiver ELISA zum Nachweis von Antikörpern

Beim kompetitiven ELISA konkurrieren Probenantikörper und antigenspezifische, enzymmarkierte Antikörper um die Bindung an das Antigen. Je höher der Antikörpergehalt der Probe ist, desto weniger enzymmarkierte Antikörper können an das Antigen binden. Die Intensität der Färbung verhält sich bei einem kompetitiven ELISA umgekehrt proportional zur Anzahl gebundener Probenantikörper.

3.3.1.3 Material und Geräte

Zur Bestimmung der Antikörpergehalte in den Immunglobulin-Präparaten und Plasmapoolproben wurden folgende kommerziell erhältliche Testkits und Geräte verwendet:

ELISA/EIA-Testkits

Parvovirus B19 IgG EIA	Biotrin International GmbH, Sinsheim
Enzygnost Anti-HAV/IgG	Dade Behring GmbH, Marburg
Enzygnost Anti-CMV/IgG	"
Enzygnost Anti-VZV/IgG	"
AUSAB EIA HBsAg	Abbott, Wiesbaden-Delkenheim

Geräte

Multi-Reagenz Waschgerät MRW	Dynatech, Denkendorf
Platten-Photometer MR5000, MR7000	"
Wärmeschrank Heraeus B5060	Heraeus, Hanau
Platten-Inkubator ThermoStar BMG	LabTechnologies GmbH, Offenburg
Plattenwaschgerät-QwikWash	Abbott, Wiesbaden-Delkenheim
Quantumatic-Photometer	"

Auswerte-Software

MikroWIN Version 2.19	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath-Untereschbach
-----------------------	--

3.3.2 Anti-Parvovirus B19-ELISA

Die Bestimmung des Anti-Parvovirus B19-Gehaltes erfolgte quantitativ gegen eine Verdünnungsreihe des 1. internationalen Parvovirus B19-Standards (100 IU/Ampulle). Dieser wurde in Probenverdünnungspuffer des Testkits auf 800, 400, 200, 100 und 50 mIU/ml eingestellt. Von jeder Standardkonzentration wurden jeweils 100 µl in Doppelbestimmung auf die Testplatten aufgetragen.

3.3.2.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Immunglobulin-Präparate wurden 1:250, 1:500 und 1:1000, die Proben der Plasmapools 1:100, 1:200 und 1:400 in Probenverdünnungspuffer des Testkits vorverdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl/Kavität in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Platten wurden mit Kunststofffolie verschlossen und für 60 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Kavitäten mit je 300 µl Waschlösung wurden die Platten auf Papiertüchern ausgeschlagen und die Kavitäten mit je 100 µl der gebrauchsfertigen Konjugatlösung (Kaninchen Anti-human IgG-POD-Konjugat) befüllt. Nach 60 min Inkubation bei RT wurden die Platten erneut wie oben beschrieben gewaschen und anschließend in jede Kavität 100 µl Substratlösung (TMB) einpipettiert. Die Enzymreaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 100 µl 1N H₂SO₄ beendet und die Extinktionen bei 450 nm Messwellenlänge und 630 nm Referenzwellenlänge mittels ELISA-Reader gemessen.

3.3.2.2 Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte nach Prüfung der Testgültigkeit mittels der Positiv- und Negativ-Kontrollen aus dem Testkit. Der Anti-Parvovirus B19-Gehalt der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt und in IU/ml angegeben. Die Auswertung erfolgte computergestützt mittels MikroWIN-Software. Als Interpolationsmethode wurde die 4-Parameter-Methode der Auswertesoftware ausgewählt, die die beste Anpassung an den sigmoidalen Verlauf der Standardkurve ermöglichte. Softwareseitig erfolgte hierzu eine logarithmische Transformation der Standardkonzentrationen, während die Extinktionswerte unverändert in die Berechnung eingingen.

3.3.3 Anti-HAV-ELISA

Die Bestimmung der Anti-HAV IgG-Antikörper wurde mit einem kompetitiven ELISA durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Verdünnungsreihe des 1. WHO-Standards für Hepatitis A Immunglobuline (GERETY, 1983). Die Standardreihe umfasste die Konzentrationen 80, 40, 20 und 10 mIU/ml. Das lyophilisierte Referenzmaterial (100 IU/Ampulle) wurde hierzu zunächst in 1 ml Aqua dest. rekonstituiert und in 50 ml Negativ-Kontrollserum aufgenommen. Ausgehend von dieser Stammlösung (2000 mIU/ml) wurden die o.g. Konzentrationen durch weitere Verdünnung 1:25, 1:50, 1:100 und 1:200 in Negativ-Kontrollserum hergestellt. Aufgetragen wurden je 25 µl in Doppelbestimmung.

3.3.3.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Immunglobulinproben wurden 1:500, 1:1000 und 1:2000, die Proben der Plasmapools 1:50, 1:100 und 1:200 in Negativ-Kontrollserum vorverdünnt. Nach dem Auftrag von je 25 µl Proben und Kontrollen wurden 50 µl HAV-Antigenlösung und 50 µl Konjugatlösung zu jeder Kavität hinzugefügt. Die Platten wurden daraufhin in einer feuchten Kammer für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit je 300 µl Waschlösung automatisiert gewaschen und verbleibende Reste der Waschlösung durch Ausschlagen der Platten auf Papiertüchern entfernt. Daraufhin wurden 100 µl Substrat (TMB) pro Kavität zugefügt und die Platten für 30 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Die Substratumsetzung wurde schließlich durch Zugabe von 100 µl 0,5 N Schwefelsäure pro Kavität abgestoppt und die Extinktion der Proben bei 450 nm Messwellenlänge und 650 nm Referenzwellenlänge mittels ELISA-Reader gemessen.

3.3.3.2 Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte nach Prüfung der Testgültigkeit mittels der Positiv- und Negativ-Kontrollen aus dem Testkit. Die Standardkurve wurde mittels MikroWin-Software nach der Punkt zu Punkt Interpolationsmethode berechnet, wobei die Dosen und die Extinktionswerte der Standardverdünnungen logarithmiert wurden. Der Anti-HAV-Gehalt der Proben wurde für jede Verdünnung einzeln berechnet und der Mittelwert als Ergebnis in IU/ml angegeben.

3.3.4 Anti-HBsAg-EIA

Zum Nachweis von Anti-HBsAg-Antikörpern wurden HBsAg-beschichtete Polystyrol-Kugeln (feste Phase) mit dem Probenmaterial inkubiert. Die Bestimmung des Anti-HBsAg-Gehaltes der Immunglobulinproben erfolgte durch Mitführen einer Verdünnungsreihe der 1. internationalen Referenzpräparation für Anti-Hepatitis B Immunglobuline (1st Reference Preparation 1977, Lot 26-1-77). Das lyophilisierte Referenzmaterial (50 IU/Ampulle) wurde dazu in 0,5 ml Aqua dest. rekonstituiert und in FKS auf 100, 50, 20, 10, 5, 2 und 1 mIU/ml eingestellt.

3.3.4.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Immunglobulinproben wurden 1:10 und 1:100 in FKS vorverdünnt. Je 200 µl der vorbereiteten Proben, Kontrollen und Standards wurden jeweils in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Testplatten pipettiert und je eine antigenbeschichtete Polystyrol-Kugel hinzugefügt. Die Platten wurden mit selbstklebenden Kunststofffolien verschlossen und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Folien wurde jede Kugel mit je 15 ml Aqua dest. mittels halbautomatischen Kugelwaschgerät (QwikWash, Abbott) gewaschen. Anschließend wurde jede Kugel mit 200 µl eines 1:1 Gemisches aus HBsAg-Biotin und Anti-Biotin-Peroxidase-Konjugat für 2 Stunden bei 40°C in einem Platteninkubator (Thermostar) inkubiert. Danach wurden die Kugeln erneut gewaschen und in Polystyrol-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von je 300 µl Substratlösung (OPD) wurde die Substratumsetzung nach 30 min Inkubation bei RT durch Zugabe von je 1 ml 1N H₂SO₄ gestoppt. Die Extinktion der Röhrchen wurde in einem Quantumatic-Photometer (Abbott) bei 492 nm gemessen.

3.3.4.2 Auswertung

Die Testgültigkeit wurde für jede Platte anhand einer Positiv-Kontrolle des Herstellers, sowie FKS als Negativ-Kontrolle kontrolliert. Zur Auswertung wurde in Excel (Microsoft) eine lineare Regressionsgerade aus den Extinktions-Mittelwerten der Standardverdünnungen berechnet. Nach Umstellung der erhaltenen Geradenfunktion wurden die Aktivitäten der verdünnten Proben bestimmt und mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren der Proben multipliziert. Als Ergebnis wurde der Mittelwert aus beiden Probenverdünnungen in IU/ml angegeben.

3.3.5 Anti-VZV-ELISA

3.3.5.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Immunglobulinproben wurden zunächst 1:25, Anti-VZV-Immunglobuline dagegen 1:50 im Probenverdünnungspuffer des Testkits vorverdünnt. Anschließend wurden sie entsprechend dem Verdünnungsschema des Herstellers 1:21, sowie final 1:11 (in der Platte) weiterverdünnt. Proben, Referenzmaterial und Kontrollen wurden in Vierfachansätzen aufgetragen. Die Platten wurden für 60 min bei 37°C im Platteninkubator inkubiert und anschließend mit 4 x 300 µl Waschlösung gewaschen. Nach dem Ausklopfen der Platten auf Papiertüchern wurden die Kavitäten mit 100 µl Anti-Human-IgG-POD-Konjugat gefüllt und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wie oben wurden den Kavitäten je 100 µl Substratlösung (TMB) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Substratumsetzung durch Zugabe von 100 µl 0,5 N H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion der Proben bei 450 nm Messwellenlänge und 630 nm Referenzwellenlänge gemessen.

3.3.5.2 Auswertung nach der α -Methode

Die Auswertung erfolgte nach der vom Testhersteller vorgegebenen α -Methode. Damit ist eine Titerbestimmung einer Probe anhand einer einzigen Probenverdünnung möglich, wodurch das übliche Ausverdünnen der Probe auf der Platte entfällt. Das Auswerteverfahren beruht auf der Kenntnis des Titerverlaufes jeder Testkit-Charge, welche vom Hersteller für jede Charge in einem iterativen Verfahren ermittelt wurde. Der Titerverlauf wird durch eine Gleichung mit den Variablen α und β beschrieben, die für jede Charge in der Testkitbeschreibung angegeben sind.

Für jede Probe bzw. Referenz wurde zunächst die Extinktionsdifferenz $\Delta E = \text{Extinktion}_{\text{Antigen}} - \text{Extinktion}_{\text{Kontroll-Antigen}}$ berechnet. Der erhaltene Wert wurde mit einem Korrekturfaktor multipliziert, der Bedingung für eine quantitative Auswertung des ELISA ist. Der Korrekturfaktor wurde aus dem Quotienten Nominalwert/Tageswert des mitgeführten Referenzmaterials berechnet.

Zur Berechnung des Anti-VZV-Gehaltes in mIU/ml wurden die korrigierten ΔE -Werte der Proben in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\log_{10} \text{ mIU/ml} = \alpha \times \Delta E^{\beta}$$

Die Ergebnisse wurden IU/ml umgerechnet und beziehen sich auf den internationalen WHO-Standard für Varicella Zoster Immunglobulin (50 IU).

3.3.6 Anti-CMV-ELISA

3.3.6.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Immunglobulinproben wurden 1:10 in Probenverdünnungspuffer vorverdünnt und anschließend entsprechend dem Verdünnungsschema des Herstellers 1:21, sowie 1:11 (in der Platte) weiterverdünnt. Proben, Referenzmaterial und Kontrollen wurden jeweils in Vierfachansätzen getestet.

Nach dem Probenauftrag wurden die Platten für 60 min bei 37°C im Platteninkubator inkubiert und anschließend mit 4 x 300 µl Waschlösung mittels ELISA-Platten-Waschgerät gewaschen. Nach Ausklopfen der Platten auf Papiertüchern wurden 100 µl der Konjugatlösung (POD-markiertes Kaninchen Anti-Human-IgG, γ -Ketten-spezifisches Fab'-Fragment) in jede Plattenvertiefung pipettiert und für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (w.o.) wurden je 100 µl Substratlösung (TMB) zu jeder Vertiefung hinzugefügt. Die Substratumsetzung wurde nach 30 min bei RT durch Zugabe von 100 µl 0,5 N H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde anschließend bei 450 nm Messwellenlänge und 630 nm Referenzwellenlänge mittels ELISA-Reader gemessen. Als Positiv-Kontrolle und zur Bestimmung des Tageswertes diente das „Anti-CMV-Referenz P/N“-Material aus dem Testkit. Als Negativ-Kontrolle wurde HSA (Humanalbumin, 50 mg/ml, Centeon Pharma) verwendet.

3.3.6.2 Auswertung (α -Methode)

Es wurden die arithmetischen Mittelwerte der Extinktionen aus der Vierfachbestimmung gebildet und die Titer der Proben nach der unter 3.3.5.2 beschriebenen α -Methode bestimmt. Die Titer der Proben wurden anschließend nach folgender Gleichung in PEI E/ml umgerechnet:

$$\text{Anti - CMV - Gehalt} = \frac{\text{Titer der Probe}}{\text{Titer des PEI - CMV - Referenzmaterials}} \times 120 \text{ PEI E/ml}$$

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde anhand eines spezifischen Anti-CMV-Immunglobulins (Cytotect; Charge 144069, Biotest Pharma GmbH, Langen) mit bekannter Mindestaktivität (50 PEI E/ml) kontrolliert.

3.3.7 Hämolyse-Hemmungsteste (HHT)

3.3.8 Anti-Staphylolysin-HHT

Der Anti-Staphylolysin-Antikörpergehalt der Immunglobulin-Präparate wurde mittels eines kommerziell erhältlichen HHT (Behringwerke, Marburg) bestimmt.

3.3.8.1 Nachweisprinzip

Staphylolysin ist ein von Staphylokokken gebildetes Hämolysin, das in der Lage ist Kaninchen-Erythrozyten zu lysieren. Die Anwesenheit von Antikörpern gegen Staphylolysin neutralisiert dessen Wirkung. Es werden mindestens drei verschiedene Toxine unterschieden: Alpha-, Beta- und Delta-Toxine (HUNGERER und RONNEBERGER, 1990). Die Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber dem *S. aureus* Alpha-Hämolysin nimmt in der Reihenfolge Kaninchen > Schwein > Rind > Ratte > Hamster > Meerschweinchen > Huhn > Mensch ab (FACKRELL, 1985). Wegen der hohen Empfindlichkeit der Kaninchen-Erythrozyten werden diese vom Testhersteller verwendet, um den Anti-Staphylolysin-Gehalt zu bestimmen.

3.3.8.2 Kontrollen

Um eine unspezifische Hämolyse der Erythrozyten durch die Immunglobulin-Präparationen auszuschließen, wurden Kontrollansätze mitgeführt, bei denen die Erythrozyten nur mit Immunglobulinproben ohne Zusatz von Staphylolysin inkubiert wurden. Zur Kontrolle der hämolytischen Aktivität der jeweils frisch angesetzten Staphylolysin-Lösung wurden die Erythrozyten nur mit Staphylolysin inkubiert. Die Eignung der Erythrozyten (alterungsbedingte Hämolyse) wurde kontrolliert, indem die Erythrozyten ausschließlich mit Phosphatpuffer inkubiert wurden.

3.3.8.3 Probenvorbereitung und Testdurchführung

Um eine komplementvermittelte Hämolyse der Erythrozyten auszuschließen, wurden Standardseren als auch Proben zunächst in einem Wasserbad für 30 min bei 56°C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben und Standardseren in Phosphatpuffer pH 7,3 verdünnt (Verdünnungsschema siehe Tabelle 10).

Tabelle 10 Verdünnungsschema der Proben und Standardseren für die Anti-Staphylolysin-Reaktion.

Reihe	Verdünnungsstufen					
A	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
B	1:12	1:24	1:48	1:96	1:192	1:384

Die Anti-Staphylolysin-Reaktion erfolgte in Mikrotitrationsplatten. Dazu wurde das im Testkit enthaltene Standardserum (1 IU/ml) und die Proben zunächst in zwei separaten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (A und B) mit dem mitgelieferten Phosphatpuffer 1:8 bzw. 1:12 vorverdünnt. Hiervon ausgehend wurden weitere Verdünnungen um den Faktor 2 in separaten Mikrotitrationsplatten hergestellt. Jeweils 50 µl aus jeder Verdünnungsreihe wurden in frische Mikrotitrationsplatten überführt und dort mit 50 µl Staphylolysin-Reagenz (0,04 E/ml) gemischt. Die Platten wurden dann für 30 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden jeweils 25 µl der 2,5%igen Kaninchen-Erythrozyten-suspension (Dade Behring, Marburg) zu jedem Ansatz hinzugefügt, gut gemischt und die Platten für 60 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

3.3.8.4 Auswertung

Von jeder Versuchsreihe wurde die erste Vertiefung mit deutlich beginnender Hämolyse ermittelt und der Anti-Staphylolysin-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität der Probe (IU/ml)} = \frac{\text{Proben - Verdünnung}}{\text{Standardserum - Verdünnung}}$$

3.3.9 Anti-Streptolysin-HHT

Die Anti-Streptolysin O-Antikörper wurden mit einem kommerziellen HHT (Streptolysin O-Reagenz; ORHI81, Behring Diagnostika, Marburg) bestimmt. Alle Reagenzien wurden nach Herstelleranweisung vorbereitet. Abweichend von der Herstelleranweisung wurde die Anti-Streptolysin-Reaktion in Mikrotiterplatten, statt in Reagenzröhrchen durchgeführt.

3.3.9.1 Nachweisprinzip

Kaninchen-Erythrozyten werden durch ein Hämolysin aus Streptokokken (Streptolysin O, ein O₂-empfindliches Hämolysin) lysiert. Anti-Streptolysin O-Antikörper neutralisieren das Hämolysin, so dass die Hämolyse der Erythrozyten gehemmt wird. Durch Ausverdünnung der Probe wird eine Anti-Streptolysin-Antikörperkonzentration erreicht, die nicht mehr in der Lage ist, das in konstanter Konzentration zugesetzte Hämolysin zu binden. Das ungebundene Hämolysin führt dann zur Hämolyse der Erythrozyten.

3.3.9.2 Kontrollen

Um eine unspezifische Hämolyse durch die IVIG auszuschließen, wurden in Kontrollansätzen Erythrozyten ohne Zusatz von Hämolysin mit den IVIG inkubiert. Zusätzlich wurden Erythrozyten in Phosphatpuffer pH 7,2 inkubiert, um deren Integrität zu kontrollieren. Zur Kontrolle der hämolysierenden Eigenschaft des verwendeten Streptolysins dienten Ansätze ohne Antikörper.

3.3.9.3 Probenvorbereitung und Testdurchführung

Die Proben und Kontrollen wurden zunächst im Wasserbad für 30 min bei 56°C inaktiviert (Komplementinaktivierung). Anschließend wurden zwei geometrische Verdünnungsreihen (A und B) mit dem Verdünnungsfaktor 2 nach Tabelle 11 in Phosphatpuffer pH 7,2 hergestellt.

Tabelle 11 Verdünnungsschema der Proben im Anti-Streptolysin-Test

Reihe	Verdünnungsstufen					
A	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
B	1:75	1:150	1:300	1:600	1:1200	1:2400

Das im Testkit beigefügte Standardserum (10 IU/ml) wurde zunächst auf 1,0 IU/ml und 1,5 IU/ml mit Phosphatpuffer pH 7,2 eingestellt. Ausgehend von diesen Konzentrationen wurden weitere Verdünnungen um den Faktor 2 hergestellt. Jeweils 50 µl aus den hergestellten Verdünnungen wurden in eine Mikrotiterplatte transferiert und mit 50 µl Streptolysin-O-Reagenz für 25 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden pro Vertiefung jeweils 25 µl der 5%igen Kaninchen-Erythrozytensuspension (Dade Behring, Marburg) zugefügt, gut gemischt und die Platten für 45 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

3.3.9.4 Auswertung

Von jeder Probe wurde die erste Vertiefung mit deutlich beginnender Hämolyse abgelesen und der Anti-Streptolysin-Gehalt wie folgt bestimmt:

Der Verdünnungsfaktor der Probe bei beginnender Hämolyse wurde mit der Anti-Streptolysin-Konzentration des Standardserums (in IU/ml) bei beginnender Hämolyse multipliziert.

3.3.10 Hämagglutinations-Hemmungstest (HAHT)

3.3.11 Anti-Röteln-HAHT

Zur Bestimmung der Röteln-Antikörper wurde ein kommerziell erhältliches Testkit (RubeHIT, Behring Diagnostika, Marburg) verwendet.

Das Testkit beinhaltet Kaolin-Suspension, CANM-Gemisch (enthält CaCl₂, NaCl, MgSO₄), lyophilisiertes Röteln-Antigen, positives und negatives Rubella-Kontroll-Serum, sowie ein Kontrollserum mit deklariertem Titer bzw. Antikörperaktivität in IE/ml. Die zur Testdurchführung benötigten Human-Erythrozyten wurden als 4%ige, stabilisierte Suspension separat bezogen (Human-Erythrozyten OSCF 15, Dade Behring, Marburg).

3.3.11.1 Nachweisprinzip

Der Röteln-Hämagglutinations-Hemmungstest beruht auf der Eigenschaft des Röteln-Virus, Erythrozyten zu agglutinieren. Spezifische Antikörper gegen das Röteln-Virus decken die für die Agglutination verantwortlichen Epitope des Virus ab und verhindern dadurch ihre Bindung an die Erythrozyten. Durch schrittweises Verdünnen der antikörperhaltigen Probe wird früher oder später eine Antikörperkonzentration erreicht, die nicht mehr ausreicht, die Agglutination zu verhindern. Der reziproke Wert der Verdünnung, die gerade noch eine Agglutination verhindert, wird als Titer der Probe angegeben. Durch Mitführen eines Präparates mit bekanntem Antikörpergehalt ist eine Umrechnung in Einheiten pro Milliliter möglich.

3.3.11.2 Kontrollen

Als Positiv-Kontrollen und zur Validierung der Ergebnisse dienten zwei im Testkit enthaltene humane Kontrollseren mit hohem bzw. niedrigem Anti-Rubella-Titer. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Rinderserum aus dem Testkit mitgeführt.

3.3.11.3 Probenvorbereitung und Testdurchführung

Zur Entfernung unspezifisch reagierender Substanzen wurden die Proben zunächst mit Kaolin vorbehandelt. Dazu wurden jeweils 600 µl Kaolin-Suspension mit 200 µl Probe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Antikörperlösung vom Kaolin zu trennen, wurden die Ansätze anschließend für 10 min mit 2900 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und die antikörperhaltigen Überstände abpipettiert.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Immunglobulin-Präparate im Vergleich zu normalen Seren höhere Antikörpertiter besitzen. Abweichend von der Versuchsvorschrift erfolgte daher für Immunglobulinproben eine zusätzliche Vorverdünnung 1:4 in CANM-Lösung.

In Mikrotiterplatten (Nunc, Dänemark) wurden die Proben und Kontrollen in einer geometrischen Verdünnungsreihe weiterverdünnt. Dazu wurden je 25 µl CANM-Lösung in die Vertiefungen der Platten vorgelegt und mit 25 µl der vorverdünnten Proben gemischt. Aus dieser Verdünnung wurden weitere Verdünnungen durch Überführen mittels Multikanalpipette in die nächste Reihe der Platte (je 25 µl) hergestellt. Die letzten 25 µl wurden verworfen. Tabelle 12 zeigt das Verdünnungsschema und die Plattenbelegung.

Tabelle 12 Verdünnungsschema und Plattenbelegung im Anti-Röteln-HAHT

	Probe 1	Probe 2	usw.	Probe 9	PK	STD	NK
A	1/32	1/32	...	1/32	1/8	1/8	1/8
B	1/64	1/64	...	1/64	1/16	1/16	1/16
C	1/128	1/128	...	1/128	1/32	1/32	1/32
D	1/256	1/256	...	1/256	1/64	1/64	1/64
E	1/512	1/512	...	1/512	1/128	1/128	1/128
F	1/1024	1/1024	...	1/1024	1/256	1/256	1/256
G	1/2048	1/2048	...	1/2048	1/512	1/512	Ery. K
H	1/4096	1/4096	...	1/4096	1/1024	1/1024	Ery. K

PK = Positiv-Kontrolle (hoher Titer)

STD = Kontroll-Serum positiv (niedriger Titer)

NK = Kontroll-Serum negativ

Ery. K = Erythrozyten-Kontrolle

Den Proben und Kontrollen wurden je 25 µl Röteln-Antigen zugesetzt und die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je Vertiefung 25 µl der mit CANM-Lösung auf 0,25% eingestellten Erythrozyten-suspension zugegeben und gut durchmischt. Zur Ablesung der Ergebnisse wurden die Platten bei Raumtemperatur bis zum nächsten Morgen erschütterungsfrei stehen gelassen.

3.3.11.4 Auswertung

Als Titer der Probe wurde diejenige Verdünnungsstufe abgelesen, bei der die Hämagglutination noch vollständig gehemmt war. Die Berechnung der Antikörperaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität der Probe (IU/ml)} = \frac{\text{Titer Probe}}{\text{Titer Standard}} * \text{Aktivität des Standards (IU/ml)}$$

3.4 Nachweis viraler Nukleinsäure in IVIG

3.4.1 Parvovirus B 19-PCR

3.4.1.1 Probennahme

Zur Verhinderung einer nachträglichen Kontamination erfolgte die Probennahme aus den Immunglobulin-Präparaten in einer sterilen Werkbank. Mittels steriler Kanülen und Spritzen wurden Aliquots entnommen und in sterile Cryoröhrchen abgefüllt. Bis zur Isolierung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Plasma-poolproben wurden direkt aus den Probenbehältnissen entnommen, wie sie beim Paul-Ehrlich-Institut von den pharmazeutischen Herstellern eingesandt wurden. Sämtliche Pipettierschritte wurden mit Pipetten durchgeführt, die ausschließlich für die PCR-Arbeit verwendet wurden. Die Pipettenspitzen (Safeseal-Tips, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) waren zertifiziert DNase-, RNase- und pyrogenfrei. Aufreinigung, Amplifikation und Gelelektrophorese fand in räumlich voneinander getrennten Laboren statt.

3.4.1.2 Isolation viraler Nukleinsäure

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden) nach einem leicht modifiziertem Protokoll des Herstellers:

In sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden je $1\mu\text{l}$ Heringssperma (Gibco BRL) vorgelegt und anschließend $200\mu\text{l}$ Probenmaterial dazu pipettiert. Zur Auflösung viraler Proteinhüllen wurden $25\mu\text{l}$ Qiagen Proteinase und $200\mu\text{l}$ Puffer AL zum Ansatz hinzugefügt und dieser für 15 Sekunden gemischt. Die Ansätze wurden anschließend für 13 min bei 70°C in einem Thermoblock (Eppendorf Thermomixer 5436) inkubiert. Je Ansatz wurden $210\mu\text{l}$ Isopropanol hinzugefügt, kurz gemischt und der Inhalt in die Zentrifugensäulchen überführt. Die Säulchen wurden 1 min bei ca. $6008 \times g$ bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Zum Waschen wurden die Säulchen in frische Auffangröhrchen eingesetzt, mit $500\mu\text{l}$ AW Puffer gefüllt und wie oben abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Im Anschluss daran wurden die Säulchen für 2 min bei max. Drehzahl der Zentrifuge ($17680 \times g$) abzentrifugiert.

Zum Eluieren der viralen Nukleinsäure wurden 200 µl erhitztes DEPC-Wasser (70°C) in die Säulchen pipettiert und diese anschließend für weitere 5 min bei 70°C in einem Thermoblock inkubiert. Danach wurden die Säulchen 1 min abzentrifugiert (RT, ca. 6000 x g), wobei das Eluat in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen wurde. Sofern das Eluat nicht sofort für die PCR eingesetzt wurde, wurde es bei –20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

3.4.1.3 Kontrollen

Bei jeder Aufreinigung wurden die folgenden Proben als Positiv-Kontrollen mitgeführt:

1. NIBSC Working Reagent for Testing Plasma Pools for Human Parvovirus B19 DNA (97/542)
2. Ein 1:100 in Negativ-Serum verdünntes B19 DNA Positiv-Kontrollserum, das freundlicherweise von Dr. Chudy (PEI) zur Verfügung gestellt wurde.
3. Eine aus verschiedenen Plasmapools hergestellte interne Positiv-Kontrolle, welche in Vorversuchen stets positiv reagierte.

Als Negativ- und Kontaminations-Kontrolle wurde DEPC-Wasser eingesetzt. Darüber hinaus wurde ein Anti-Parvovirus B19 negatives Humanserum mitgeführt.

3.4.1.4 Amplifikation der isolierten DNA

Für die 1. Amplifikation wurden 5 µl der unter 3.4.1.2 isolierten Nukleinsäure mit 45 µl des Reaktionsansatzes (siehe Tabelle 13) vermischt.

Die Amplifikation wurde durch Inkubation mit Taq-Polymerase bei 95°C für 10 min in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Weiterstadt) gestartet. Es folgten 40 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 94°C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 56°C (Primer-Anlagerung) und 30 Sekunden bei 72°C (Synthesereaktion). Den Abschluss des letzten Zyklus bildete eine verlängerte Synthesephase für 10 Minuten bei 72°C.

3.4.1.5 2. Amplifikation (nested)

Für die nested-PCR wurden 2 µl des ersten Amplifikates mit 48 µl des Reaktionsansatzes 2 (siehe Tabelle 13) vermischt. Die Amplifikation wurde durch Inkubation mit Taq-Polymerase bei 95°C für 10 Minuten gestartet, gefolgt von 30 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 94°C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 56°C (Primer-Anlagerung) und 30 Sekunden bei 72°C (Synthesereaktion). Den Abschluss des letzten Zyklus bildete eine verlängerte Synthesephase für 10 Minuten bei 72°C.

3.4.1.6 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden die Amplifikate auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid markiert.

Zunächst wurde ein 2%iges Agarosegel angefertigt. Dazu wurden 2 g Agarose-Pulver (SeaKem LE Agarose) abgewogen und mit TAE 1x-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde dann in einem Mikrowellenherd solange bis zum Sieden erhitzt, bis die Lösung vollkommen schlierenfrei war. Während das Gel abkühlte, wurde 1 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung dem Gel unter Rühren zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Somit wird die DNA – falls vorhanden – als violett fluoreszierende Bande im Gel sichtbar. Das noch flüssige Gel wurde in eine mit Kämme bestückte horizontale Elektrophoresekammer gegossen und solange stehen gelassen, bis die Flüssigkeit ausgeleert war. Das Gel wurde daraufhin mit TAE-Puffer überschichtet und die Kämme entfernt.

Je 10 µl der Proben wurden mit 1 µl Loading-Buffer gemischt und davon 10 µl pro Geltasche aufgetragen. Als Größenmarker diente eine 100 bp DNA Leiter (GibcoBRL, Life Technologies). Die Kammer wurde an ein Netzgerät (Model 250/2.5; BioRad) angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die Spannung betrug konstant 70 V bei 700 mA. Nach ca. 45 min Laufzeit wurde die Elektrophorese beendet und das Gel entnommen. Die Visualisierung und Auswertung der Gele erfolgte auf einem UV-Lichtkasten. Mittels digitaler Videokamera wurden die Ergebnisse dokumentiert.

3.4.1.7 PCR-Reaktionsansätze, Reagenzien, Geräte

Tabelle 13 PCR-Reaktionsansätze für die 1. und 2. Amplifikation

Reagenzien	1. Amplifikation Volumen pro Ansatz (μ l)	2. Amplifikation Volumen pro Ansatz (μ l)
DEPC-H ₂ O	29,75	32,15
PCR-Puffer II (10 x)	5	5
dATP (10mM)	1	1
dCTP (10mM)	1	1
dGTP (10mM)	1	1
dTTP (10mM)	1	1
(+) Primer (50 μ M)	0,3	0,6
(-) Primer (50 μ M)	0,3	0,6
MgCl (25mM)	5	5
BSA (10mg/ml)	0,4	0,4
AmpliTaQ Gold (5 U/ μ l)	0,25	0,25
Gesamtvolumen	45	48

Für die PCR wurden folgende, z.T. gebrauchsfertigen Reagenzien verwendet:

Reagenzien	Bezug
Nukleotide (dNTPs)	Perkin-Elmer, Weiterstadt
10 x PCR Puffer II	Perkin-Elmer, Weiterstadt
(100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl pH 8,3)	
MgCl ₂ -Lösung (25 mM MgCl ₂)	Perkin-Elmer, Weiterstadt
gereinigtes Bovines Serum Albumin	New England BioLabs
100 x (10mg/ml)	
thermostabile DNA Polymerase	Perkin-Elmer, Weiterstadt
AmpliTaQ Gold (5 Units/ μ l)	
DEPC-Wasser	PEI-Lösungsmittellabor

Die Amplifikationen wurden in einem Thermocycler der Fa. Perkin-Elmer (Gene Amp PCR System 9600) durchgeführt. Als Reaktionsgefäße wurden PCR Softstrips (Volumen 0,2 ml) der Fa. Biozym verwendet, die mit einzeln verschließbaren Deckelchen ausgestattet waren, um eine evtl. Kontamination benachbarter Reaktionsgefäße zu verhindern.

3.4.1.8 PCR-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt bezogen. Das Primerpaar für die 1. Amplifikation besaß folgende Sequenzen:

Primersequenz für die 1. Amplifikation

Name F52 (25mer): 5'-GTG-GTG-AAA-GCT-CTG-AAG-AAC-TCA-G-3'

Name B75 (24mer): 5'-CCA-TCC-ATT-ATA-CCA-AGC-CCC-TAC-3'

Der Primer F52 bindet an die Position 1930-1954, der Primer B75 an die Position 2276-2253 des viralen Nichtstruktur Protein (NS)-Gens.

Das Primerprodukt (F52-B75) besitzt eine Größe von 347 bp.

Um die Empfindlichkeit der PCR zu erhöhen, wurde ein zweiter Amplifikationszyklus angeschlossen. Als Matrize für das zweite Primerpaar diente das Amplifikationsprodukt der ersten Amplifikation. Das Primerpaar für die nested-PCR besaß folgende Sequenzen:

Primersequenz für die 2. (nested) Amplifikation

Name F55 (24mer): 5'-CTT-TTT-TAA-CCT-CAT-CAC-CCC-AGG-3'

Name B66 (23mer): 5'-CAC-CGT-CCC-ACA-CAT-AAT-CAA-CC-3'

Der Primer F55 bindet an die Position 1964-1987, der Primer B66 an die Position 2172-2150 des viralen NS-Gens.

Das Primerprodukt (F55-B66) besitzt eine Größe von 209 bp.

3.4.1.9 Zusammensetzung von Loading- und TAE-Puffer

Aufnahmepuffer (Loading-Buffer) der PCR-Produkte für die Gelelektrophorese:

Loading-Buffer

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol FF	0,25%
Sachcharose	40% (w/v)

Lauf- und Ansatzpuffer (TAE-Puffer) der Gele:

1 x TAE-Puffer

Tris-Base	40 mM
Eisessig	1 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

3.5 Funktionelle Prüfung der IVIG

3.5.1 Fc-Funktionstest

Die Fc-Region der Antikörper ist an der Auslösung immunologisch wichtiger Effektorfunktionen beteiligt, wie z.B. die Aktivierung des Komplementsystems auf klassischem Weg oder die Erhöhung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen, die spezifische Fc-Rezeptoren für IgG an der Zelloberfläche besitzen. Zur Prüfung der Integrität der Fc-Region wurde der Fc-Funktionstest entsprechend den Vorgaben des DAB durchgeführt (V.2.2.10, DAB 10). Die Monographie für normale Immunglobuline zur intravenösen Applikation fordert, dass das angewandte Herstellungsverfahren zu Produkten führt, die der Prüfung auf Fc-Funktion entsprechen. Die Präparate müssen im Vergleich zu einem biologischem Referenzpräparat (BRP) eine Mindestaktivität von 60% aufweisen.

3.5.1.1 Methode

Der Fc-Funktionstest beruht auf der Eigenschaft der Antikörper nach Antigenbindung das Komplementsystem auf dem klassischen Weg zu aktivieren. Die Aktivierung des Komplementsystems führt letztlich zur Bildung eines Membrane Attack Complexes (MAC), der zytolytisch wirkt. Als Zielzellen dienen mit Rötelnantigen beschichtete Humanerythrozyten der Blutgruppe 0. Die beschichteten Erythrozyten bilden mit den Anti-Röteln-Antikörpern aus der Probe einen Komplex, an dem zugefügtes Komplement aktiviert wird. Komponenten des Komplementsystems lagern sich auf der Erythrozytenoberfläche ab und bilden letztlich Poren in der Zellmembran, die zur Hämolyse der Zelle führen. Mit zunehmender Hämolyse klart die Erythrozytensuspension auf, wobei Hämoglobin freigesetzt wird. Die Erythrozytenlyse kann im Absorptionsmaximum von Hämoglobin (541 nm) photometrisch verfolgt werden.

3.5.1.2 Blutgewinnung

Blut der Blutgruppe 0 wurde durch Venenpunktion gesunder Mitarbeiter des PEI gewonnen. Das Blut wurde zunächst in Serumröhrchen aufgefangen und sofort in Röhrchen (Greiner) überführt, die 1 ml Acidum-Citricum-Dextrose (ACD) als Antikoagulans enthielten (1 ml ACD + 9 ml Blut).

3.5.1.3 Tannieren der Erythrozytenoberfläche

Das mit ACD stabilisierte Blut wurde zentrifugiert (1000 x g, 4 min) und der Überstand abgehoben. Die Zellen wurden anschließend 3 mal in PBS gewaschen. 0,2 ml des gewaschenen Sediments wurden mit 9,8 ml PBS zu einer 2%igen Erythrozytensuspension verdünnt. Davon wurden 7,5 ml mit dem gleichen Volumen Gerbsäure-Gebrauchslösung (0,1 ml Stammlösung + 7,4 ml PBS) gemischt und für 10 min bei 37°C in einem Wasserbad (Kottermann Typ 3043, Hänigsen) inkubiert. Anschließend wurde erneut abzentrifugiert (1000 x g, 4 min), der Überstand verworfen und das Sediment nochmals in PBS gewaschen. Nach Abheben des Überstandes wurde das Sediment in 14,5 ml PBS resuspendiert, um eine ca. 1%ige Erythrozytensuspension zu erhalten.

3.5.1.4 Beschichten der tannierten Erythrozytenoberfläche mit Röteln-Antigen

5 ml der 1%igen Erythrozytensuspension wurden mit 1 ml Röteln-Antigen (Rubella Antigen, Dade Behring, Marburg) gemischt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 x g, 10 min) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen Albumin-Barbitalpuffer (ABBS) resuspendiert und erneut mit ABBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen 1:10 verdünnt, um deren Konzentration mittels Absorptionsmessung auf einen OD-Wert von $1,0 \pm 0,1$ bei 541 nm einzustellen.

3.5.1.5 Antikörperbindung an beladene Erythrozyten

Um eine Schädigung der Erythrozyten zu verhindern, wurde der pH Wert der sauren Immunglobuline zunächst mit 1 M NaOH neutralisiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben auf 30 mg/ml bzw. 40 mg/ml mit ABBS eingestellt. Die gleiche Prozedur wurde auch mit der Antikörper-Referenzpräparation (Human Immunoglobulin BRP Batch 1, Straßburg, Frankreich) durchgeführt, deren Fc-Aktivität bei der späteren Auswertung als Bezugsgröße diente.

900 µl der so vorbereiteten Proben und Referenzen wurden in Küvetten (Plastibrand 1,5 ml halbmikro, Brand GmbH + Co, Wertheim) mit 100 µl der Erythrozytensuspension gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1000 µl ABBS zu jeder Küvette hinzugefügt, gut durchmischt und die Zellen durch Zentrifugation (1000 x g , 10 min) am Küvettenboden gesammelt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden 1900 µl Überstand abgehoben und gegen frische ABBS-Lösung gleichen Volumens ersetzt. Anschließend wurde nochmals abzentrifugiert und 1800 µl vom Überstand jeder Küvette abpipettiert.

3.5.1.6 Antikörperabhängige Komplement vermittelte Hämolyse

Nachdem die Küvetten in einem temperierten Küvettenhalter des Photometers (Spectronic Genesys 2PC, Spectronic Instruments, Rochester, NY) für 2 min vorgewärmt waren, wurden 600 µl ABBS-Lösung (37°C) zu jeder Küvette hinzugefügt und die Erythrozyten durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig resuspendiert. Zu jeder Küvette wurden 200 µl eisgekühltes Meerschweinchen-serum als Komplementquelle hinzugefügt und die Aufzeichnung der zeitlichen Änderung der Absorptionswerte bei 541 nm gestartet. Der Messvorgang wurde nach Erreichen eines unteren Plateaus beendet.

3.5.1.7 Auswertung

Prinzipiell beruht die Auswertung auf dem Verhältnis zwischen zwei Steigungswerten (S_{exp}). Dazu wurde jeweils der größte Wert der Steigung in der Hämolysekurve des Referenzmaterials, als auch der Probe bestimmt. Da die anfänglichen Extinktionswerte einer Messreihe jedoch in Abhängigkeit der Zahl der in der Küvette befindlichen Erythrozyten variieren kann, müssen die Steigungswerte korrigiert werden. Die Auswertung erfolgte wie folgt:

Die Hämolysekurve wurde in Zeitintervalle von 0,5 min unterteilt und die Steigung (S) zwischen zwei benachbarten Datenpunkten nach folgender Formel berechnet:

$$S = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Der größte berechnete S -Wert diente als $S_{\text{experimentell}}$ (S_{exp}). Zusätzlich wurde die Absorption (A_s) durch Extrapolation der Kurvenform am Anfang der Messung bestimmt. S_{exp} wurde durch die folgende Formel korrigiert:

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_s}$$

Anschließend wurde der arithmetische Mittelwert der gefundenen S' jedes Präparationspaares errechnet und für Bestimmung eines Index für die Fc-Aktivität (I_{Fc}) in die folgende Formel eingesetzt:

$$I_{\text{Fc}} = \frac{(\overline{S'} - \overline{S'c})}{\overline{S's} - \overline{S'c}} * 100$$

wobei

$\overline{S'}$ = arithmetischer Mittelwert der korrigierten Steigung der Probe

$\overline{S's}$ = arithmetischer Mittelwert der korrigierten Steigung der Referenzpräparation

$\overline{S'c}$ = arithmetischer Mittelwert der korrigierten Steigung der Komplementkontrolle

3.5.1.8 Material + Reagenzien

ACD-stabilisierte Humanerythrozyten der Blutgruppe 0 wurde von freiwilligen, gesunden Mitarbeitern des PEI gewonnen.

Als Komplementquelle diente bei -70°C gelagertes Meerschweinchenserum. Für die Gewinnung des Meerschweinchenserums wurde Blut frisch entbluteter Meerschweinchen von der zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Institutes zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde sofort auf Eis gestellt und die normale Gerinnung abgewartet. Das Serum über dem Blutkuchen wurde abgehoben, aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Das verwendete Rubella-Antigen (ORDZ 04/05) wurde von den Behringwerken (Marburg) als Lyophilisat bezogen und vor Gebrauch in 1 ml Aqua dest. gelöst.

3.5.1.9 Rezepturen für Puffer und Lösungen

Barbitalpuffer-Stammlösung (pH 7,3)

Natriumchlorid	41,5 g
Barbitalnatrium	5,096 g
Aqua.dest.	ad 800 ml

Der pH-Wert wurde mit 1M HCl auf pH 7,3 eingestellt. Der Lösung wurden 2,5 ml Magnesium/Kalzium-Stammlösung hinzugefügt, mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend sterilfiltriert.

Magnesium/Kalzium-Stammlösung

Kalziumchlorid	1,103 g
Magnesiumchlorid	5,083 g
Aqua.dest.	ad 25 ml

Albumin-Barbitalpuffer-Stammlösung (ABBS)

Rinderalbumin	150 mg
(gelöst in 20 ml Barbitalpuffer-Stammlösung)	
Aqua.dest.	ad 100 ml

Gerbsäure-Stammlösung (0,01%)

Tannin	1,0 mg
PBS	ad 10 ml

Gerbsäure-Gebrauchslösung

Gerbsäure-Stammlösung	0,1 ml
PBS	+ 7,4 ml

3.5.2 Fc-Rezeptor-Bindungstest

Effektorfunktionen der Antikörper, wie Phagozytosesteigerung, Blockade von Fc-Rezeptoren, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) werden durch die Bindung der Ak an zellständige Fc-Rezeptoren vermittelt. Um das Bindungsverhalten der verschiedenen IVIG-Präparate an Fc-Rezeptoren zu untersuchen, wurde der im folgenden beschriebene Fc-Bindungstest entwickelt:

3.5.2.1 Prinzip

Die Messung der Fc-Rezeptor-Bindung beruht auf der Fähigkeit der Antikörper, mittels ihrer Fc-Region an zellständige Fc-Rezeptoren zu binden. Dazu wurden Fc-Rezeptor exprimierende Zellen mit den IVIG inkubiert und anschließend die an die Zelloberfläche gebundenen IgG-Antikörper über einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper, der gegen humanes IgG gerichtet ist, mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

3.5.2.2 Auswahl einer Fc-Rezeptor tragenden Zelllinie

Voraussetzung für den Bindungsversuch ist die Verwendung von Zellen, die Fc-Rezeptoren exprimieren. Drei Zelllinien MonoMac 6, U-937 und THP-1 wurden als Zelllinien beschrieben, die Fc-Rezeptoren exprimieren (ZIEGLER-HEITBROCK, 1988; SUNDSTRÖM, 1976; TSUCHIYA, 1980). In einem Vorversuch wurden diese Zelllinien mit verschiedenen Anti-Fc-Rezeptor-Antikörper (CD16, CD32 und CD64) inkubiert und der Anteil positiver Zellen bestimmt. Von den untersuchten Zelllinien zeichnete sich die THP-1-Zelllinie durch die höchste Fc-Rezeptor-Expression aus, so dass diese für die Bindungsversuche eingesetzt wurde.

3.5.2.3 Herkunft und Eigenschaften der THP-1-Zelllinie

Die THP-1 Zellen (DSM ACC 16) stammten aus der Zellkulturbank des Paul-Ehrlich-Institutes. Die Zelllinie ist eine humane Leukämiezelllinie, die aus dem Blut eines Jungen mit akuter monozytärer Leukämie kultiviert wurde (TSUCHIYA et al., 1980). Nach dessen Untersuchungen besitzt die Zelllinie Fc- und C3b-Rezeptoren und weist Eigenschaften von Monozyten (z.B. Lysozymbildung, Phagozytose) auf.

3.5.2.4 Kultivierung der THP-1-Zellen

Die Zellen wurden dreimal in der Woche mit FKS supplementiertem RPMI 1640 Medium versorgt, wobei die Zellzahl jeweils auf $3 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte liegend in 200 ml Zellkulturflaschen (Nunc Surface, Fa. Nunc) in einem begasten Brutschrank (Cytoperm 8080, Fa. Heraeus) bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und einem CO₂-Anteil von 5%.

Das Kulturmedium besaß folgende Zusammensetzung:

Kulturmedium

RPMI 1640 + 2g Bicarbonat pro Liter	400 ml
1 M HEPES	4 ml
Streptomycin- Penicillin-L-Glutamin-Mix	10 ml
Fötale Kälber Serum, bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert (Seramed)	40 ml

Die RPMI 1640/Bicarbonat-Lösung, der Antibiotika/Glutamin-Mix sowie der HEPES-Puffer wurden vom Lösungsmittellabor des Paul-Ehrlich-Instituts bezogen. Die Herstellung erfolgte dort nach folgenden Rezepturen:

RPMI 1640 1x mit 2g Bicarbonat/Liter

RPMI 1640 (Pulver)	10,41 g
NaHCO ₃	2,00 g
entmineralisiertes Wasser	ad 1000 ml

Streptomycin-Penicillin-L-Glutamin-Mix

Streptomycinsulfat	25,0 g
Penicillin	15,7 g
L-Glutamin	75,0 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml
anschließend autoklaviert	

1M HEPES (pH 5,5)

HEPES	1191,5 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml

3.5.2.5 Durchführung des Fc-Rezeptor-Bindungstestes

3.5.2.6 Konzentrieren und Waschen der THP-1-Zellen

Für den Versuch wurden die Zellen aus mehreren Zellkulturflaschen in 50 ml konische Greiner Röhrchen überführt und bei 1200 Upm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert (Heraeus Variofuge). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet anschließend in 50 ml kaltem PBS (ohne Ca⁺ und Mg⁺) resuspendiert. Daraufhin wurde erneut, wie beschrieben, abzentrifugiert und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Zählkammer (Neubauer) auf $2,5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

3.5.2.7 Inkubation mit IVIG

Die IVIG-Proben wurden zunächst mit PBS/HSA (0,1%) auf einen IgG-Gehalt von 1 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden die Proben in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 weiter verdünnt, so dass ein Konzentrationsbereich von 0,001 µg/ml bis 100 µg/ml abgedeckt wurde.

Jeweils 100 µl der vorverdünnten IVIG wurden mit 100 µl Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen) auf einer Mikrotiterplatte (Nunc Surface, Kat.-Nr.:163320, Nunc, Wiesbaden) vermengt und für 30 min bei 4°C inkubiert.

3.5.2.8 Entfernung ungebundener Antikörper

Um nicht zellgebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Platten zunächst abzentrifugiert (2000 Upm, 5 min, 4°C; Heraeus Plattenzentrifuge) und der Überstand mittels eines ELISA-Waschgerätes (Dynatech MRW) abgesaugt. Das Waschgerät wurde so justiert, dass nur der Überstand aspiriert wurde ohne dabei die am Boden der U-förmigen Vertiefungen befindlichen Zellpellets abzusaugen. Anschließend dispensierte das Gerät pro Vertiefung 250 µl der Waschlösung (PBS/HSA 0,1%). Der Waschvorgang wurde anschließend noch 3 x wiederholt.

3.5.2.9 Detektion gebundener Antikörper

Die Detektion der an die Fc-Rezeptoren gebundenen Antikörper erfolgte durch Markierung mit PE-konjugierten Anti-human IgG Antikörper. Dazu wurden je 20 µl/Vertiefung des 1:10 in PBS/HSA vorverdünnten Antikörpers zu den Zellen hinzugefügt und die Platten für 30 min bei 4-8°C inkubiert.

Nach zwei automatisierten Waschschritten, wie oben beschrieben, wurden die Zellen in 200 µl PBS/HSA aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Direkt im Anschluss daran erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Informationen über den zum Nachweis von humanem IgG verwendeten Antikörper sowie die Zusammensetzung der Wasch- und Verdünnungslösung sind im folgenden aufgeführt:

Anti-human IgG-Antikörper

Hersteller: Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
 Vertrieb: Dianova, Hamburg
 Hersteller-Code: 109-116-098
 Spezifität: Anti-human IgG (Fcγ-spezifisch)
 Spenderspezies: Ziege
 Molekülform: F(ab)₂
 konjugiert mit: R-Phycoerythrin (PE)

Wasch- und Verdünnungslösung (PBS/HSA 0,1%)

Human Albumin (50 mg/ml) 20,4 ml
 PBS + 1000 ml

3.5.2.10 Nachweis der Fc-Rezeptor-Expression auf Zelllinien

Der Nachweis der Fcγ-Rezeptoren I bis III (CD64, CD32, CD16) erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz-Markierung der Rezeptoren mit monoklonalen FITC-markierten Antikörpern. 100 µl Aliquots der vorbereiteten und gewaschenen Zellen ($2,5 \times 10^5$ /ml) wurden mit 20 µl der FITC-markierten Antikörper für 30 min bei + 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen in 750 µl PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl PBS aufgenommen und der Anteil positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die verwendeten Antikörper wurden von Pharmingen, San Diego CA bezogen.

Makierung/Spezifität	Klon	Isotyp	Katalog-Nr.
FITC anti-Human CD 16	3G8	Maus IgG1, κ	30624X
FITC anti-Human CD 32	FLI8.26 (2003)	Maus IgG2b, κ	30934X
FITC anti-Human CD 64	10.1	Maus IgG1, κ	31844X

3.5.3 Phagozytostest

Für die durchflusszytometrische Analyse der Phagozytoseleistung von Granulozyten wurde ein kommerziell erhältliches Testkit (PHAGOTEST, Orpegen, Heidelberg) verwendet. Der Test wurde ursprünglich zur Prüfung der Phagozytoseleistung von Granulozyten in Vollblut entwickelt. Eine modifizierte Testdurchführung ermöglicht jedoch auch die opsonisierenden Eigenschaften von Serum zu prüfen. Für die Untersuchung von IVIG wurde der Test prinzipiell wie folgt durchgeführt:

In PBS gewaschenes humanes Vollblut wurde zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der Immunglobulin-Präparate und einer gleichbleibenden Menge FITC-markierter Bakterien (*S. aureus*) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt, die Bakterien phagozytierten.

3.5.3.1 Differenzierung zwischen zelladhärenten und inkorporierten Bakterien

Um zwischen adhären und tatsächlich inkorporierten Bakterien differenzieren zu können, wurde die Fluoreszenz der nicht aufgenommenen Bakterien durch einen Färbeschritt unterdrückt (Quenchen). Bakterien, die sich bereits im Zellinneren der Phagozyten befinden, kommen nicht in Kontakt mit der Färbelösung (Quenching-Solution) und fluoreszieren deshalb weiterhin.

Die üblicherweise dem Testkit beiliegenden Bakterien (*E.coli*, FITC-markiert und in Serum opsonisiert) wurden nicht verwendet. Statt dessen wurden FITC-markierte, nicht opsonisierte *S. aureus* Bakterien (ATCC Nr. 25923 bzw. DSM Nr. 1104) verwendet, die optional vom Hersteller angeboten wurden. Der Keim stammt aus einem klinischen Isolat und wird hauptsächlich zur Qualitätskontrolle nach DIN 58959-7 bei der Bestimmung von Antibiotika-Empfindlichkeiten eingesetzt.

Sonstige Reagenzien, wie Waschlösung, Quenching-Solution und die DNA-Staining-Solution stammten aus dem Testkit und wurden entsprechend der Herstelleranweisung verwendet.

3.5.3.2 Gewinnung und Vorbereitung des Blutes

Das Blut gesunder Spender wurde am Versuchstag morgens in Blutentnahmehöhrchen (S-Monovette mit 15 I.U. Heparin/ml Blut, Sarstedt) durch Venenpunktion entnommen.

Um die im Plasma des Spenders vorhandenen Antikörper und Komplementkomponenten zu entfernen, wurden die Höhrchen zunächst bei 2000 U/min für 10 min bei +4°C abzentrifugiert (Heraeus Minifuge 2) und die Höhe des Plasmas auf dem Höhrchen markiert. Danach wurde das Plasma über dem Zellsediment abpipettiert. Das gewonnene Plasma wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort auf Eis gelegt. Es diente in den Versuchen als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit der Phagozyten, nachdem das Vollblut wie folgt in PBS gewaschen wurde:

Die am Höhrchenboden befindlichen Zellen wurden in 7,5 ml kaltem PBS (+4°C) resuspendiert und das Höhrchen erneut abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde dieser Waschschrift noch 3 mal wiederholt. Am Ende des letzten Waschschriftes wurde das Höhrchen bis zur angebrachten Markierung mit PBS aufgefüllt, um die Konzentration der gewaschenen Zellen wieder der ursprünglichen Ausgangskonzentration im Spenderblut anzugleichen.

3.5.3.3 Probenvorbereitung und Kontrollen

Die Immunglobulinproben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 1:10, 1:100 und 1:1000 in PBS (ohne Ca^+ und Mg^+) verdünnt.

Als Negativ-Kontrollen dienten PBS, Human Serum ohne IgA/IgM/IgG (Sigma), sowie ein Ansatz ohne Bakterien. Als Positiv-Kontrollen wurden Ansätze hergestellt, denen 100 µl des zunächst abgehobenen Plasmas wieder zugesetzt wurden.

Um den Einfluss des im Plasma enthaltenen Komplements zu bestimmen, wurde ein Aliquot Spenderplasma für 30 min bei 56°C zur Komplementinaktivierung erhitzt.

3.5.3.4 Inkubation

Je 100 µl des unter 3.5.3.2 vorbereiteten Blutes wurden auf den Boden von – im Eiswasserbad stehenden – Polypropylen-Röhrchen (Falcon 2052, Becton Dickinson) pipettiert. Zu diesen Zellen wurden je 100 µl der unter 3.5.3.3 vorverdünnten Proben bzw. Kontrollen hinzugefügt und kurz gemischt.

Darauf hin wurden die Ansätze im Eiswasserbad für 10 min abgekühlt, um die Phagozytoseaktivität während der Bakterienzugabe bis zur eigentlichen Inkubation zu verhindern.

Anschließend wurden zu jedem Ansatz 20 µl der eisgekühlten Bakterien-suspension (*S. aureus*, FITC-markiert, Lot # 1518) hinzugefügt. Um den Ansatz zu mischen, wurde jedes einzelne Röhrchen zügig aus dem Eiswasserbad entnommen, kurz auf einem Schüttler durchmischt und sofort wieder in das Eiswasserbad zurückgestellt.

Alle Ansätze wurden anschließend gleichzeitig in ein Schüttelwasserbad gesetzt und für 10 min bei 37°C unter Rotation (Frequenz 84 Upm/min) inkubiert. Danach wurden alle Proben gleichzeitig aus dem Wasserbad entnommen und die Phagozytose durch Zurückstellen ins Eiswasserbad beendet.

Die Fluoreszenz der nicht ingestierten, freien oder an den Zelloberflächen adhären-ten Bakterien wurde durch Zugabe von 100 µl/Ansatz eisgekühlter Quenching-Lösung unterdrückt.

3.5.3.5 Auswaschen der Quenching-Lösung

Um die Quenching-Lösung zu entfernen, wurden je 3 ml Waschlösung in die Röhrchen gegeben, und diese anschließend für 5 min (250 x g, +4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Waschriff wie beschrieben noch einmal wiederholt.

3.5.3.6 Lyse und Fixation der Zellen

Zum Zellsediment wurden jeweils 2 ml Lysing-Solution hinzugefügt und die Ansätze im Dunklen bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurden Röhrchen abzentrifugiert (5 min, 250 x g, 4°C) und der Überstand dekantiert.

3.5.3.7 Auswaschen der Lysis-Solution

Die Proben wurden wie unter 3.5.3.5 beschrieben einmal gewaschen.

3.5.3.8 DNA-Färbung

Die DNA der Zellen wurde mit einem DNA-Farbstoff angefärbt, um in der späteren FACS-Analyse zwischen kernhaltigen und nicht kernhaltigen Zellen (z.B. nicht lysierte Erythrozyten) differenzieren zu können. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl DNA Staining-Solution (Propidiumiodid) hinzugefügt und die Röhrchen für 10 min auf Eis inkubiert.

3.5.3.9 Durchflusszytometrische Analyse

Die Messung wurde mit einem Durchflusszytometer (FACScan) der Fa. Becton Dickinson durchgeführt. Die Aquisition und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm CellQuest (Becton Dickinson).

Um Bakterien- bzw. Thrombozytenaggregate auszuschließen, wurden während der Messung durch Setzen eines „Live Gate“ nur solche Ereignisse erfasst, die dem DNA-Gehalt einer menschlichen haploiden Zelle entsprachen (FL2-Peak). Je Probe wurden 10000 Zellen gemessen. Zur Analyse wurde zunächst die Größe der Zellen (FSC) gegen deren Granularität (SSC) im Dotplot Diagram dargestellt, was die Differenzierung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ermöglichte. Die Lage der Granulozyten wurde anschließend durch eine Region markiert, so dass nur diese in der weiteren Auswertung berücksichtigt wurden. Deren Granularität (SSC; x-Achse) wurde gegen ihre Fluoreszenz (FL1, y-Achse) dargestellt. Anhand der Negativ-Kontrolle (Ansatz ohne Bakterien) wurde ein Schwellenwert definiert, so dass bei den Proben zwischen phagozytierenden und nicht phagozytierenden Granulozyten differenziert werden konnte.

Für jede Immunglobulinverdünnung wurde der Anteil phagozytierender Zellen aller erfassten Granulozyten bestimmt und als Prozentwert angegeben.

3.6 Statistik

3.6.1.1 Mittelwerte

Die Berechnung von Mittelwerten erfolgte in der Regel durch Bildung des arithmetischen Mittelwertes:

Arithmetisches Mittel:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Für die Mittelwertbildung der im Röteln-HAHT erhaltenen Titer wurde das geometrische Mittel wie folgt gebildet:

Geometrisches Mittel:
$$G = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n}$$

3.6.1.2 Standardabweichung

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Stichproben aus der Grundgesamtheit aller produzierten Proben. Die Berechnung der Standardabweichung (s) erfolgte daher ausgehend von Stichproben nach der n-1 Methode:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n - 1}}$$

3.6.1.3 Statistische Testverfahren

Zur Beurteilung, inwieweit ein virusinaktivierender Herstellungsschritt Einfluss auf die untersuchten Parameter besitzt, wurden die Daten an mehreren Chargen der Präparate vor und nach Einführung der Behandlung bestimmt und die arithmetischen Mittel eines jeden Präparatepaares mittels T-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. In Abhängigkeit des Versuchsaufbaues wurde der zweiseitige T-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben mit einem Signifikanz-Niveau von 5% angewandt. Die Berechnungen erfolgten mittels des Statistikprogramms GraphPad Prism (Version 3.00) für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Proteinzusammensetzung

4.1.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteinzusammensetzung der IVIG zu charakterisieren, wurden Proben der verschiedenen Präparate mittels SDS-PAGE untersucht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte sowohl unter reduzierenden (DTT), als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen. Diese Technik ermöglicht eine hochauflösende Trennung der Proteine im Gel, so dass mögliche IgG-Spaltprodukte, wie sie bei der Fragmentierung der Ig-Moleküle auftreten, erfasst werden können.

Für den Vergleich zwischen Vorgänger- und virusinaktiviertem Nachfolgepräparat wurden die Proben parallel auf das gleiche Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch visuellen Vergleich der erhaltenen Bandenmuster.

4.1.1.1 Proteinzusammensetzung vor und nach virusinaktivierenden Herstellungsschritten

Die zusätzliche S/D-Behandlung bei Präparat A+ führte im Vergleich zu dem Vorgängerpräparat A zu keinem veränderten Bandenmuster (Spuren 1-3 in Abbildung 2). Die Bandenmuster beider Präparate wiesen aber, im Unterschied zu anderen Präparaten, zwei zusätzliche Banden auf, deren Molekulargewichte zwischen denen von H- und L-Ketten lagen. Die starke Ausprägung der beiden zusätzlichen Banden war kennzeichnend für dieses Präparat und weist auf eine Fragmentierung des IgG-Moleküls durch die bei der Herstellung angewandte Trypsinbehandlung hin. Zusätzlich wurden schwächere Proteinbanden in Höhe der 14 kD-Markierung festgestellt, deren Herkunft ebenfalls auf die Proteasebehandlung zurückgeführt wird.

Kein Unterschied konnte zwischen dem β -Propiolacton-behandelten Präparat C und dem zusätzlich nanofiltrierten Nachfolgepräparat C+ festgestellt werden. Bis auf eine geringfügig intensiver gefärbte Bande, dicht oberhalb der 67 kD Bande bei Präparat C, waren die Bandenmuster beider Präparate identisch (Spuren 4-6 in Abbildung 2).

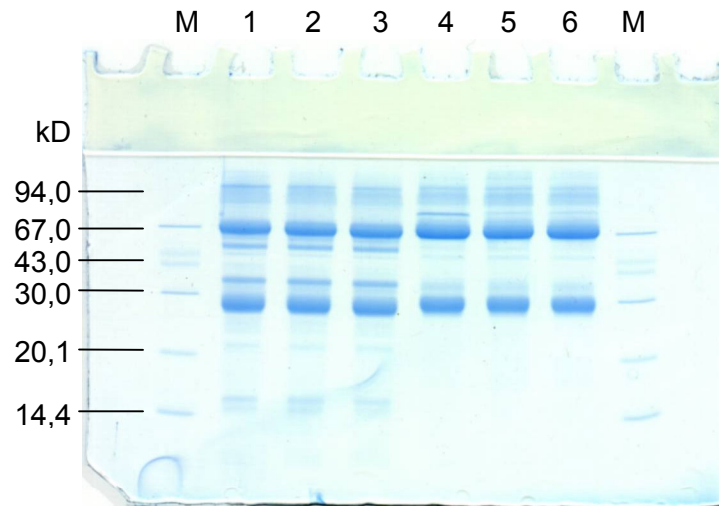


Abbildung 2 SDS-PAGE (reduziert, Coomassieblau-Färbung) vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte. M = Grössenmarker, Spur 1+2 = zwei verschiedene Chargen des Trypsin-behandelten Präparates A vor der Virusinaktivierung, Spur 3 = Präparat A+ nach zusätzlicher S/D-Behandlung, Spur 4 = Präparat C nicht nanofiltriert, Spur 5+6 = Präparat C+ nach Nanofiltration.

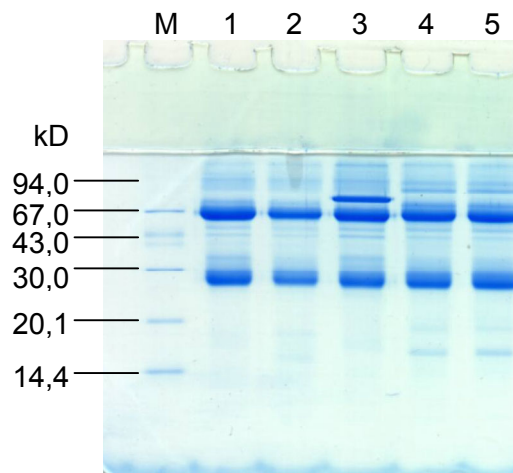


Abbildung 3 SDS-PAGE (reduziert, Coomassieblau-Färbung) vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte. M = Grössenmarker, Spur 1 = Präparat M+ (S/D + pH 4,25), Spur 2 = Präparat D (Trypsin-behandelt), Spur 3 = albuminhaltiges IVIG des DRK, Spur 4 = Präparat E (sulfoniert) vor Fettalkoholbehandlung, Spur 5 = Präparat E+ (sulfoniert) nach Fettalkoholbehandlung.

Die bei Präparat E+ zur Virusinaktivierung zusätzlich eingeführte Fettalkoholbehandlung bewirkte keine Änderung der Proteinzusammensetzung, wie der Vergleich der Bandenmuster zwischen dem Vorgängerpräparat E und dessen Nachfolgepräparat E+ (Spur 4+5 in Abbildung 3) zeigt.

Das S/D-behandelte nicht modifizierte Präparat H+ zeigte das gleiche Bandenmuster wie das nicht virusinaktivierte Präparat H (Abbildung 4). Beide enthalten human Albumin als Stabilisator, das sich als zusätzliche Bande darstellte.

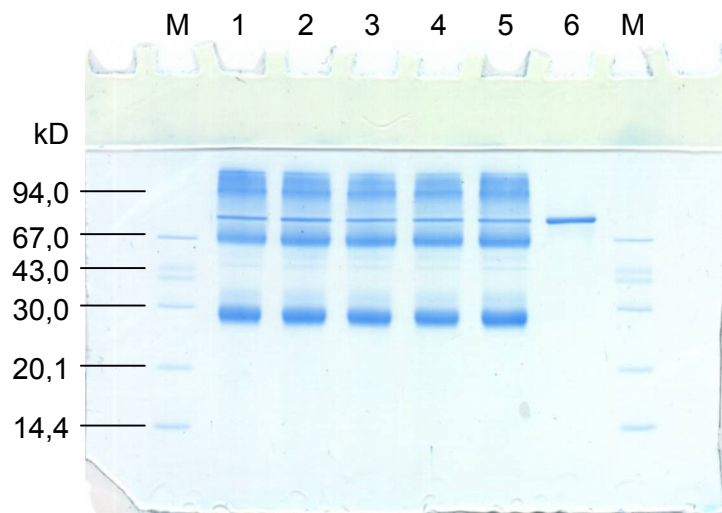


Abbildung 4 SDS-PAGE (reduziert, Coomassieblau-Färbung) vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.
M = Größenmarker, Spur 1+2 = zwei verschiedene Chargen des Präparates H vor S/D-Behandlung, Spur 3-5 = drei verschiedene Chargen des Präparates H+ nach S/D-Behandlung. Das Präparat enthält Albumin (3 mg/ml), das als zusätzliche Bande in Höhe von human Albumin (Spur 6) zu erkennen ist.

4.1.1.2 Enzymatisch modifizierte IVIG

Die zur besseren i.v.-Verträglichkeit bei einigen Präparaten eingeführte Behandlung mit Proteasen führte teilweise zu deutlich veränderten Bandenmustern bei den betreffenden Präparaten. Wie bereits weiter oben erwähnt, zeigten sich bei den Trypsin-behandelten Präparaten A und A+ zusätzliche Banden, die charakteristisch für dieses Präparat waren.

Die durch Proteasen-Behandlung bewirkten Modifikationen der IVIG waren am deutlichsten bei dem Pepsin-behandelten Präparat B zu erkennen. Die bei allen anderen Präparaten vorhandene Bande in Höhe von 67 kD (H-Kette) fehlte bzw. war nur schwach zu erkennen (Spur 2 in Abbildung 6). Nach Herstellerangaben besteht das Präparat aus dem F(ab)₂-Anteil eines IgG-Antikörpers und wird entsprechend als 5S-Präparat deklariert.

Das ebenfalls Pepsin-behandelte Präparat D zeigte dagegen keine Degradation im Bandenmuster (Spur 2 in Abbildung 3). Der Hersteller gibt an, dass die angewandte Herstellungsmethode schonend für das IgG-Molekül sei. Diese beinhaltet neben einem pH 4-Schritt eine Inkubation mit Pepsin bei 37°C für 9 ($\pm$ 3) Stunden.

4.1.1.3 Chemisch modifizierte IVIG

Der Einfluss der Sulfonierung bei den Präparaten E bzw. E+, d.h. die Spaltung des Moleküls durch Einlagerung von SH-Gruppen, zeigte sich erst unter nicht reduzierenden Bedingungen. Es wurden 4-5 Banden unterschiedlichen Molekulargewichts sichtbar (Spur 6 in Abbildung 8). Andere nicht modifizierte IVIG wiesen dagegen unter der gleichen Bedingung nur eine Immunglobulin-Bande mit einem Molekulargewicht > 94 kD auf (Abbildung 8).

Die Reaktion mit β -Propiolacton führt bei den Präparaten C, C+ und F durch die Einlagerung einer chemischen Gruppe zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes (STEPHAN, 1980), wodurch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE verzögert werden sollte. Dies konnte aufgrund der relativ kurzen Trennstrecke der Mini-Gele nicht beobachtet werden. Die Anreicherung des ebenfalls β -Propiolacton-behandelten Präparates F mit IgM bewirkte, dass das makromolekulare IgM aufgrund seiner Größe in der Auftragschale des Gels zurückgehalten wurde, wenn die Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde (Spur 2 in Abbildung 8). Die IgG-Bande stellte sich dagegen wie bei anderen Präparaten dar.

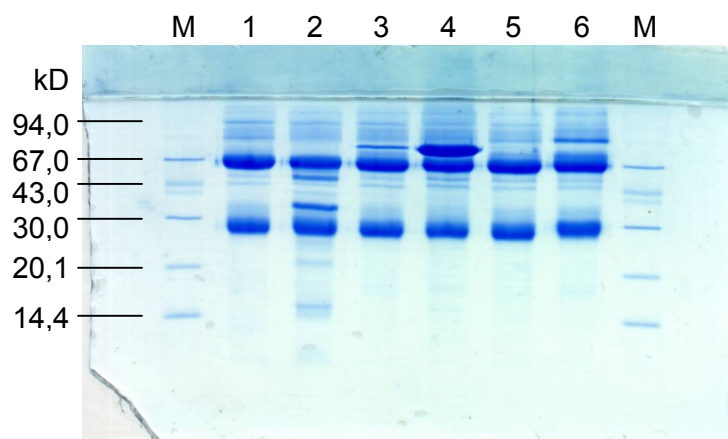


Abbildung 5 SDS-PAGE (reduziert, Coomassiefärbung) verschiedener IVIG-Präparate. M = Grössenmarker. *Nicht modifizierte IVIG*: Spur 1 = Präparat G, Spur 3 = Präparat H⁺ (albuminhaltig), Spur 4 = Präparat I (enthält zu 50% Albumin), Spur 5 = Präparat L. *Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG*: Spur 2 = Präparat A⁺ (Trypsin-behandelt), Spur 6 = Präparat F (β -Propiolacton-behandelt, enthält ca. 12% IgM).

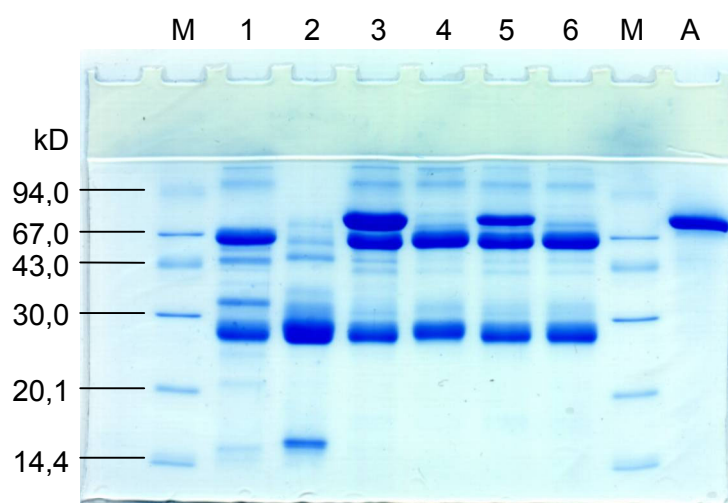


Abbildung 6 SDS-PAGE verschiedener IVIG-Präparate (reduziert, Coomassiefärbung). M = Grössenmarker, A = human Albumin. *Nicht modifizierte IVIG*: Spur 3 = Präparat I (S/D, 50% Albumin), Spur 5 = hitzeinaktiviertes Präparat J (33% Albumin), Spur 6 = Präparat L. *Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG*: Spur 1 = Präparat A (Trypsin-behandelt), Spur 2 = Präparat B (Pepsin-behandelt), Spur 4 = Präparat C⁺ (β -Propiolacton-behandelt).

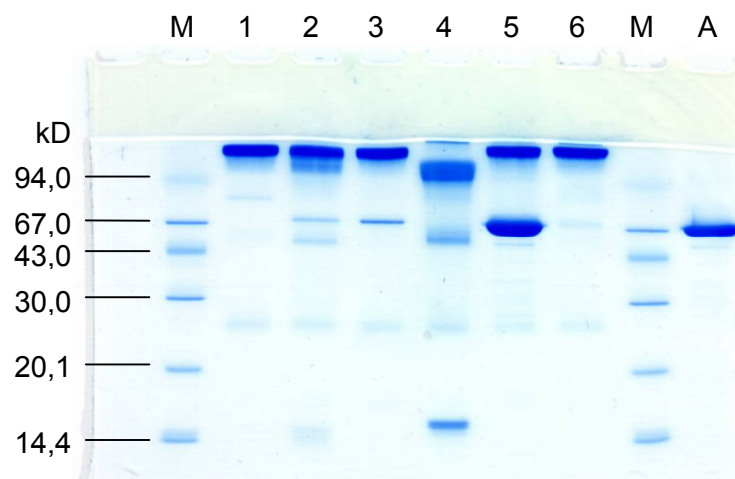


Abbildung 7 SDS-PAGE verschiedener IVIG unter nicht reduzierenden Bedingungen (Coomassiefärbung). Das Molekulargewicht der IgG-Antikörper beträgt ca. 150 kD (Banden kurz unterhalb des Sammelgels). Spur 1 = Präparat G, Spur 2 = Präparat A (Trypsin-behandelt), Spur 3 = Präparat H⁺ (enthält 3% Albumin), Spur 4 = Präparat B (Pepsin-behandelt), Spur 5 = Präparat I (enthält 50% Albumin), Spur 6 = Präparat C⁺ (β -Propiolacton-behandelt), A = human Albumin, M = Grössenmarker.

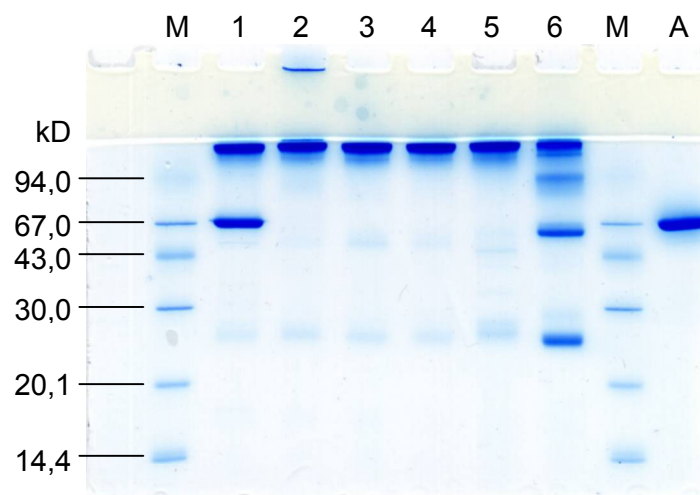


Abbildung 8 SDS-PAGE verschiedener IVIG unter nicht reduzierenden Bedingungen (Coomassiefärbung). Spur 1 = Präparat J (enthält 33% Albumin), Spur 2 = Präparat F (β -Propiolacton-behandelt, enthält 12% IgM), Spur 3 = Präparat M (pH 4,25), Spur 4 = Präparat M⁺ (S/D-behandelt, pH 4,25), Spur 5 = Präparat D (Pepsin und pH4-behandelt), Spur 6 = Präparat E⁺ (sulfoniert, Fettalkohol-behandelt), M = Grössenmarker, A = human Albumin.

4.1.2 Immunoblotting (Western Blot)

In der SDS-PAGE wurden bei allen untersuchten Präparaten zusätzliche Banden mit einem Molekulargewicht > 67 kD gefunden. Um abzuklären, inwieweit es sich bei diesen Banden um Proteine der Immunglobulinklasse handelt, wurden einige IVIG-Proben erneut in der SDS-PAGE getrennt (Gelgröße 16 cm x 20 cm) und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Durch Anfärbung des Gesamtproteins mit Ponceau S wurde kontrolliert, dass alle Proteine bis zur Größe 200 kD auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden (Abbildung 9). Zum Nachweis der Immunglobuline wurde die Blotmembran mit einem Anti-human IgG-Peroxidasekonjugat inkubiert. Die Bindung des Konjugates wurde durch Zugabe eines chemilumineszierenden Substrates (peroxidaseabhängig) und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht.

Das Autoradiogramm zeigte, dass der Anti-human IgG-Antikörper an alle Banden der Immunglobulin-Präparate gebunden wurde. Die Bindung war für Immunglobulinprotein spezifisch, da der Antikörper nicht mit Albumin reagierte, welches in den Präparaten H und H⁺ enthalten ist (Abbildung 10).

Die in der SDS-PAGE vorgefundenen Banden oberhalb der 55 kD Markierung wurden als Antikörperproteine identifiziert. Die Banden bestehen zum Teil aus inkompletten Antikörpern, d.h. aus verschiedenen schweren Kombinationen von L- und H-Ketten, was durch die erneute Inkubation der Blotmembran mit einem Anti-human L-Ketten Peroxidasekonjugat bestätigt werden konnte (Abbildung 10, linke Seite). Der Anti-L-Ketten Antikörper wurde an die Banden der leichten Ketten bei ca. 25-30 kD und zusätzlich an die Banden bei ca. 97 kD gebunden.

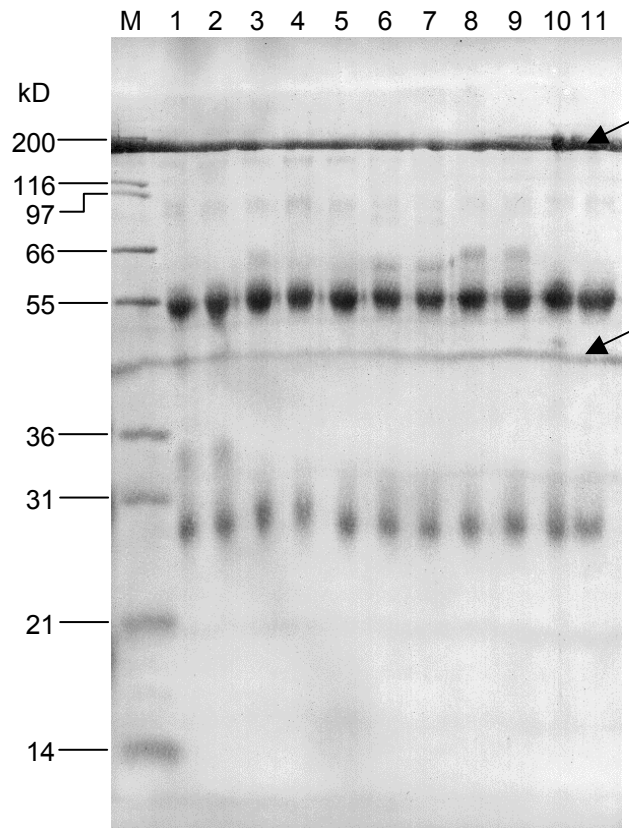


Abbildung 9 Western-Blot von verschiedenen IVIG-Präparaten nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Die Vollständigkeit des Proteintransfers wurde durch die Färbung mit Ponceau S überprüft. Die markierten Linien (→) stellen Färbungsartefakte dar.
Spur 1 + 2 = Präparat A bzw. A+, Spur 3, 4 und 5 = Präparat C, C+ und K, Spur 6 + 7 = Präparat E bzw. E+, Spur 8 + 9 = Präparat H bzw. H+, Spur 10 + 11 = Präparat M bzw. M+

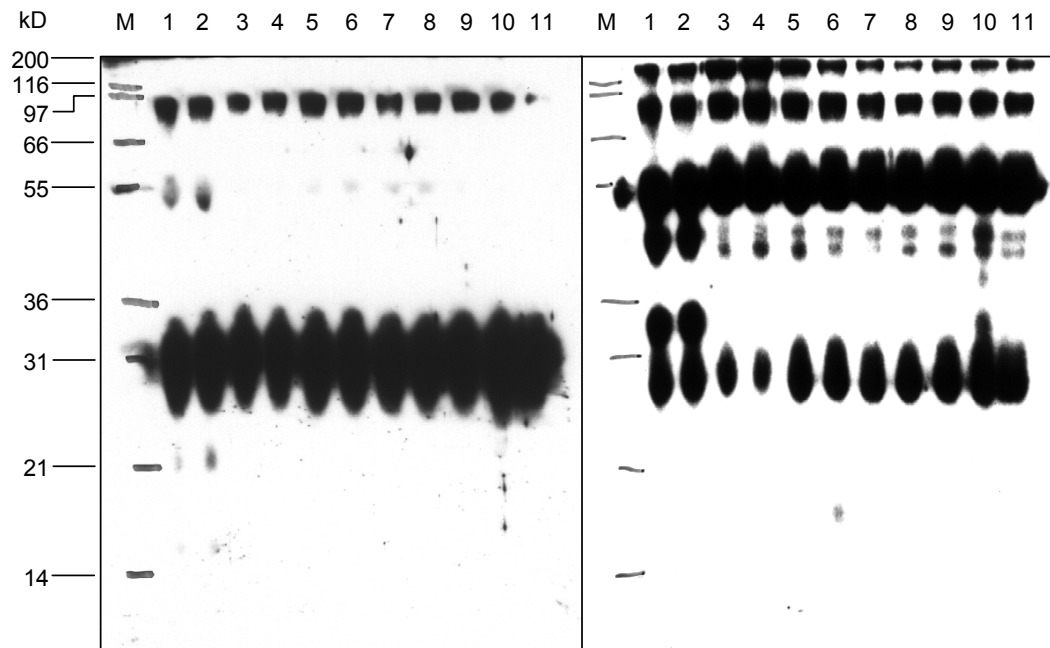


Abbildung 10 Autoradiogramm des Immunoblots verschiedener IVIG.
 Links: Blotmembran nach Inkubation mit Anti-human L-Ketten-Peroxidase-Konjugat. Rechts: Die gleiche Membran inkubiert mit Anti-human IgG-Peroxidase-Konjugat.

Spur 1 + 2 = Präparat A bzw. A+
 Spur 3, 4 + 5 = Präparat C, C+ und K
 Spur 6 + 7 = Präparat E bzw. E+
 Spur 8 + 9 = Präparat H bzw. H+
 Spur 10 + 11 = Präparat M bzw. M+

4.1.3 IgG-Subklassenbestimmung

Die untersuchten Immunglobulin-Präparate enthalten nach Herstellerangaben vorwiegend Antikörper der Klasse IgG, deren Subklassenverteilung nach der Arzneibuchmonographie für intravenöse Immunglobuline in der Gebrauchsinformation der Präparate zu deklarieren ist. Ein Vergleich der verschiedenen Präparate anhand von Herstellerangaben ist aber nur bedingt möglich, da selten die gleiche Bestimmungsmethode angewandt wird. Um vergleichbare Daten zu erhalten wurde - besonders im Hinblick auf die zusätzlichen Virusinaktivierungsschritte - die IgG-Subklassen-Zusammensetzung exemplarisch an zwei bis drei Chargen der jeweiligen IVIG mit der gleichen Methode bestimmt. Präparatepaare vor und nach Einführung von virusinaktivierenden Schritten wurden parallel auf der gleichen Testplatte getestet. Die Bestimmung erfolgte mittels radialer Immundiffusion (RID) in Agarosegelplatten, die monoklonale Antikörper gegen die jeweilige IgG-Subklasse enthielten. Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben (Kapitel 3.2.3).

In Tabelle 14 bis Tabelle 17 (Seite 83-84) sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur IgG-Subklassenverteilung der verschiedenen Immunglobulin-Präparate zusammengefasst.

4.1.3.1 Präparatepaare

Die Präparate, bei denen ein direkter Vergleich vor und nach Einführung virusinaktivierender Schritte am Endprodukt möglich war, wurden paarweise auf der gleichen RID-Platte aufgetragen. Die Ergebnisse sind Abbildung 11 vergleichend dargestellt.

Die zusätzlich S/D-virusinaktivierten Chargen des Präparates A+ wiesen gegenüber dem Vorläuferprodukt A leicht erhöhte Gehalte an IgG1 (34,3 mg/ml vs 36,2 mg/ml) und IgG2 (16,4 mg/ml vs 18,8 mg/ml) auf, während der IgG4-Gehalt (0,8 mg/ml vs 0,7 mg/ml) praktisch unverändert blieb. IgG3 wurde nur in einer Charge des Präparates A+ in geringer Menge (0,2 mg/ml) gemessen. In den anderen Chargen des Präparates konnte dagegen kein IgG3 nachgewiesen werden.

Die β -Propiolacton-behandelten Präparate C und C+ (nanofiltriert) enthielten ebenfalls nur geringe Mengen an IgG3. Die IgG-Subklassen-Gehalte variierten jedoch – wie bei auch bei anderen IVIG – von Charge zu Charge. Im Vergleich zu dem nanofiltrierten Präparat C+ enthielt das Vorgängerpräparat C einen reduzierten Gehalt an IgG2 und IgG4, während IgG3 erhöht war. Der IgG1-Gehalt der beiden Präparate lag in vergleichbaren Größenordnungen.

Die Subklassenzusammensetzung der einer Sulfitolyse unterzogenen Präparate E/E+ war nach zusätzlicher Fettalkoholbehandlung (Präparat E+) nahezu unverändert. Die stärkste Abweichung zeigte sich eher noch in einem tendenziell niedrigeren IgG3-Gehalt bei den zusätzlich Fettalkohol-behandelten Chargen des Präparates E+.

Die nicht modifizierten Präparatepaare besaßen gegenüber den modifizierten IVIG-Paaren einen deutlich höheren IgG3-Gehalt.

Bei den S/D-behandelten Chargen des Präparates H+ wurde ein erhöhter IgG1-Gehalt gemessen, während der IgG2-Gehalt leicht reduziert war. Der Gehalt an IgG3 und IgG4 war bei beiden Präparationen gleich. Bei dem zweiten Präparatepaar M/M+ konnten hingegen keine Unterschiede im Subklassengehalt vor und nach Einführung der S/D-Behandlung festgestellt werden.

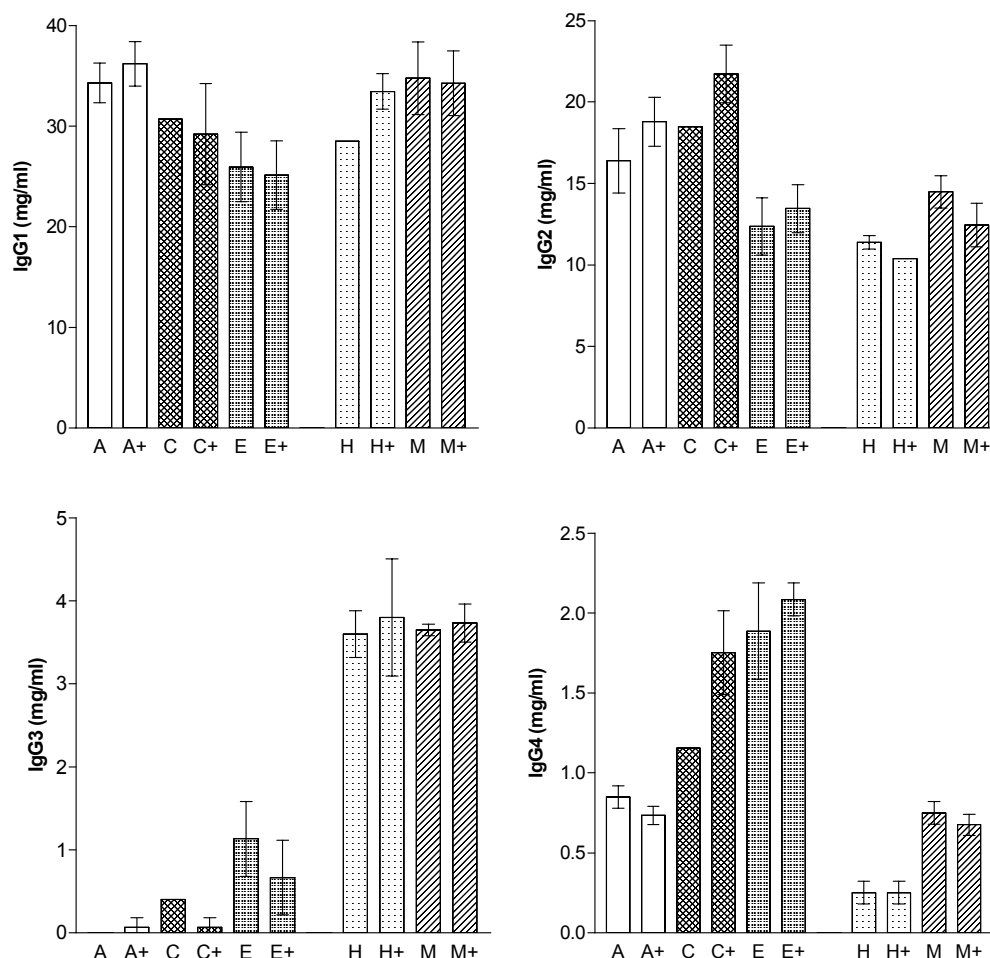


Abbildung 11 IgG-Subklassen-Gehalt in IVIG, vor und nach (+) Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte (Mittelwerte $\pm$ 1 SD). Die Präparatepaare A/A+, C/C+ und E/E+ sind chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG. Präparate H/H+ und M/M+ sind nicht modifiziert. Die unterschiedliche Skalierung der y-Achse ist zu beachten.

4.1.3.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Das Pepsin gespaltene Präparat B reagierte mit den mAk der IgG3-Platte unter Ausbildung eines Präzipitatrings, dagegen nicht auf den Platten, die mAk gegen die Subklassen IgG1, 2 und 4 enthielten. Der aus den Ringdurchmessern abgeleitete IgG3-Gehalt betrug im Mittel 5,1 mg/ml und erreichte damit die höchsten gemessenen IgG3-Werte aller untersuchten Präparate.

In dem pH4/Pepsin-behandelten Präparat D konnten dagegen alle vier Subklassen nachgewiesen werden. Das IgM-angereicherte und β -Propiolacton-behandelte Präparat F enthielt ebenfalls alle Subklassenantikörper. Im Vergleich zu den anderen Präparaten enthielt es den durchschnittlich niedrigsten IgG2-Gehalt.

4.1.3.3 Nicht modifizierte IVIG

Die mittleren IgG1-Gehalte nicht modifizierter Präparate variierten im Bereich von 23,5 mg/ml (Präparat J) bis 37,5 mg/ml (Präparat G). Deutliche Unterschiede zeigten sich auch im IgG2-Gehalt der nicht modifizierten Präparate. Es wurden Konzentrationen von 10,4 mg/ml (Präparat H+) bis 19,4 mg/ml (Präparat K) nachgewiesen. Die niedrigste IgG3-Konzentration wurde bei dem hitzebehandelten Präparat G (0,7 mg/ml) gemessen, dass gleichzeitig die höchsten IgG1-Gehalte aufwies.

Die nicht modifizierten IVIG enthielten, mit Ausnahme von Präparat K (1,4 mg/ml), relativ niedrige IgG4-Level (< 0,8 mg/ml).

4.1.3.4 Relativer Anteil der IgG-Subklassen am Gesamt-IgG-Gehalt

Der Proteingehalt der IVIG variiert innerhalb der zugelassenen Spezifikationsgrenzen von Charge zu Charge. Damit variiert auch der absolute Gehalt der IgG-Subklassen von Charge zu Charge. Der relative Gehalt (Anteil der einzelnen Subklassen bezogen auf den Gesamt-IgG-Gehalt der Charge) bleibt davon unbeeinflusst. Daher wurde für jede Charge die Summe der Subklassen IgG1 bis IgG4 gebildet (=100%) und der relative Anteil einzelner Subklassen am Gesamt-IgG in % bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 zusammengefasst.

Die zusätzlichen Virusinaktivierungsschritte verursachten keine signifikante Änderung der relativen IgG-Subklassenverteilung. Zwischen den verschiedenen IVIG-Präparaten konnten jedoch Unterschiede in der IgG-Subklassen-Zusammensetzung gemessen werden.

Tabelle 14 Konzentration der Subklassen IgG1-4 in modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
A	2		$16,4 \pm 2,0$	n.n.	$0,9 \pm 0,1$
A+		$36,2 \pm 2,2$	$18,8 \pm 1,5$	n.n.	$0,7 \pm 0,1$
B	2	n.n.	n.n.	$5,1 \pm 0,1$	n.n.
	1	30,7	18,5	0,4	
C+	3	$29,2 \pm 5,0$	$21,7 \pm 1,8$		$1,8 \pm 0,3$
D	2	$30,7 \pm 1,8$	$16,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
E	3	$25,9 \pm 3,4$	$12,4 \pm 1,8$	$1,1 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,3$
E+	3	$25,1 \pm 3,5$	$13,5 \pm 1,5$	$0,7 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,1$
F	2	$34,7 \pm 0,0$	$9,9 \pm 2,1$	$3,3 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,6$

n.n.= nicht nachweisbar

Tabelle 15 Konzentration der Subklassen IgG1-4 in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
G	2	$37,5 \pm 2,0$	$12,3 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,3$
H	2	$28,5 \pm 0,0$	$11,4 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$
H+	2	$33,5 \pm 1,8$	$10,4 \pm 0,0$	$3,8 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,1$
I	2	$26,8 \pm 0,8$	$14,5 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$
J	2	$23,5 \pm 8,3$	$10,4 \pm 0,0$	$3,1 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,1$
K	2	$27,7 \pm 0,8$	$19,4 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,0$
L	2	$28,9 \pm 4,5$	$11,1 \pm 2,6$	$2,8 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$
M	2	$34,8 \pm 3,6$	$14,5 \pm 1,0$	$3,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
M+	3	$34,3 \pm 3,2$	$12,5 \pm 1,3$	$3,7 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$

Tabelle 16 Modifizierte IVIG: relativer Anteil der IgG-Subklassen am Gesamt-IgG

Präparat	Probenanzahl (n)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
A	2	66,6 ± 1,4	31,8 ± 1,4	n.n.	1,6 ± 0,0
A+	3	64,9 ± 0,7	33,7 ± 1,0	0,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
B	2	n.n.	n.n.	100*	n.n.
C	1	60,4	36,4	0,8	2,4
C+	3	55,1 ± 6,0	41,4 ± 5,0	0,1 ± 0,2	3,4 ± 0,8
D	2	59,5 ± 0,7	31,0 ± 0,5	6,5 ± 0,2	3,0 ± 0,0
E	3	62,6 ± 4,5	30,1 ± 5,1	2,7 ± 1,0	4,6 ± 0,5
E+	3	60,7 ± 1,2	32,6 ± 0,8	1,6 ± 1,1	5,1 ± 0,6
F	2	68,8 ± 2,8	19,5 ± 3,3	6,6 ± 1,4	5,1 ± 0,9

n.n.= nicht nachweisbar

* = rein rechnerisch

Tabelle 17 Nicht modifizierte IVIG: relativer Anteil der IgG-Subklassen am Gesamt-IgG

Präparat	Probenanzahl (n)	IgG1 (%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG4 (%)
G	2	73,3 ± 3,8	24,0 ± 1,8	1,4 ± 1,4	1,4 ± 0,6
H	2	65,1 ± 0,3	26,1 ± 0,8	8,2 ± 0,7	0,6 ± 0,2
H+	2	69,8 ± 0,0	21,7 ± 1,2	7,9 ± 1,1	0,5 ± 0,1
I	2	60,4 ± 1,0	32,8 ± 0,2	6,2 ± 1,1	0,6 ± 0,2
J	2	61,4 ± 8,8	28,3 ± 6,1	8,4 ± 1,8	1,9 ± 0,8
K	2	55,4 ± 0,6	38,7 ± 1,8	3,1 ± 1,2	2,8 ± 0,1
L	2	66,5 ± 6,8	25,7 ± 7,4	6,3 ± 0,8	1,5 ± 0,2
M	2	64,7 ± 3,6	27,1 ± 3,2	6,8 ± 0,5	1,4 ± 0,1
M+	3	67,0 ± 2,8	24,4 ± 2,2	7,3 ± 0,5	1,3 ± 0,2

4.2 Bestimmung spezifischer Antikörper in IVIG

In den IVIG-Präparaten wurden Antikörper gegen virale und bakterielle Antigene mit unterschiedlichen Bestimmungsmethoden wie ELISA, HHT oder HAHT bestimmt. Einige der Methoden wurden dazu neu im Labor etabliert. Soweit Ergebnisse aus den durchgeführten Vorversuchen für die Interpretation der Endergebnisse relevant erschienen, wurden sie an den Anfang der jeweiligen Untersuchungsergebnisse gestellt.

Um die mit den virusinaktivierten Präparaten erhaltenen Ergebnisse mit denen der Vorgängerpräparate vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der Präparatepaare zusätzlich grafisch dargestellt. Die Ergebnisse der Präparate, für die kein Präparatepaar zur Verfügung stand, werden im Anschluss daran beschrieben, wobei zwischen modifizierten und nicht modifizierten Immunglobulin-Präparaten unterschieden wird.

4.2.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.2.2 Anti-Parvovirus B19-ELISA

4.2.2.1 Vorversuche zur Quantifizierbarkeit des eingesetzten ELISA

Der eingesetzte ELISA-Test wurde seitens des Herstellers zunächst für den qualitativen Nachweis von Parvovirus B19 IgG-Antikörpern in menschlichem Plasma oder Serum angeboten. Um quantitative Messungen durchführen zu können, wurde das Ende 1995 erstmalig zu Verfügung stehende Internationale Standardserum für Parvovirus B19 (100 IU/Ampulle) zur Erstellung einer Kalibrationskurve verwendet (FERGUSON, 1995).

Um den Messbereich zu ermitteln, wurde das Parvovirus B19 Standardserum zunächst im verwendeten ELISA-System austitriert. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der erhaltenen Titrationskurve. Bei Einsatz von hohen Dosen des Standards wurden nur niedrige Extinktionswerte erreicht. Mit zunehmender Verdünnung stiegen die Extinktionswerte zunächst bis zu einem Maximalwert an, um bei weiterer Verdünnung wieder abzunehmen. Die anfängliche Reduktion der Extinktionswerte wurde auf ein als Prozone-Effekt beschriebenes Phänomen zurückgeführt. Bei zu hohen Antikörperkonzentrationen kommt es im ELISA-System wahrscheinlich zu einer sterischen Inhibition der Antikörpermoleküle, so dass deren Bindung an das Antigen nicht optimal erfolgen kann.

Um den Prozone-Effekt zu vermeiden und um einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Dosis und erhaltener Extinktion zu erhalten, wurde als Verdünnungsbereich für den Parvovirus B19 Standard die Verdünnung 1:128 bis 1:2048 gewählt, entsprechend einer Konzentration von 78 mIU/ml bis 0,048 mIU/ml.

Der Einfachheit halber wurde der Standard für die folgenden Versuche 1:125 bis 1:2000 (80 mIU/ml bis 0,050 mIU/ml) verdünnt.

Die Proben wurden in Vorversuchen ebenfalls austitriert, um geeignete Verdünnungen zu finden, bei denen einerseits Prozone-Effekte auszuschließen waren und andererseits die gemessenen Extinktionswerte innerhalb der Standardkurve zu liegen kamen.

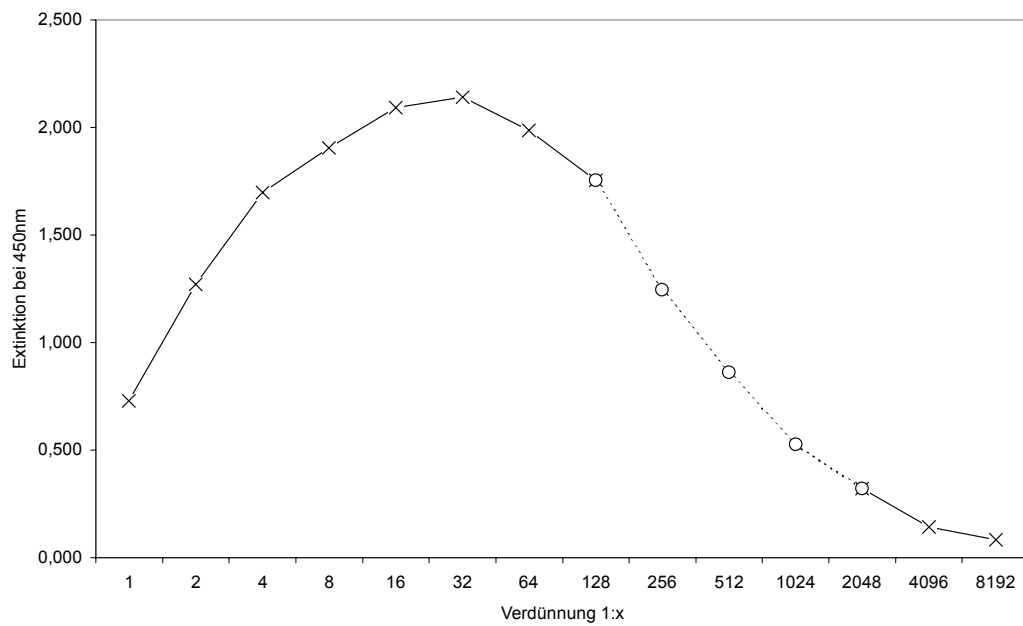


Abbildung 12 Extinktionsverlauf bei Titration des zur Quantifizierung von IVIG verwendeten 1. Internationalen Standards für Anti-Parvovirus B19 Serum (NIBSC Code 93/724) im Biotrin Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgG). Bei hohen Antikörperkonzentrationen zeigte sich ein Prozonenphänomen. Die gepunktete Linie zeigt den Verdünnungsbereich des Serums, der für die Bildung der Standardkurve ausgewählt wurde.

4.2.2.2 Parvovirus B 19-Antikörpergehalt in IVIG

Der Antikörpergehalt gegen Parvovirus B19 in den Präparaten wurde mit einem ELISA-Testkit bestimmt. Die Bestimmungsmethode beruht auf der Bindung der Antikörper an das auf den ELISA-Platten gebundene Virusantigen. Die Detektion erfolgt über einen enzymkonjugierten Zweitantikörper, der gegen den Fc-Teil der Probenantikörper gerichtet ist. Das Messprinzip setzt daher einen intakten Fc-Bereich als Bindungsstelle für den Zweitantikörper voraus.

4.2.2.3 Präparatepaare

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der untersuchten Präparatepaare vor und nach Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass die modifizierten IVIG im Vergleich zu den nicht modifizierten deutlich niedrigere Antikörpergehalte besitzen. So wurde bei modifizierten Präparaten ein Anti-Parvovirus B19 Gehalt von 28,9 IU/ml (Präparat C+) bis 59,6 IU/ml (Präparat E+) gemessen, während nicht modifizierte IVIG 185,3 IU/ml (Präparat M) bis 283,6 IU/ml (Präparat H+) enthielten.

Nach Einführung zusätzlicher virusinaktivierender Herstellungsschritte wurden in den Präparaten A+, E+, H+ und M+ höhere, bei dem nanofiltrierten Präparat C+ dagegen niedrigere Werte gemessen.

In den Chargen des Trypsin-behandelten Präparates A wurden durchschnittlich 39,2 IU/ml gemessen. Dagegen enthielten die ebenfalls Trypsin-behandelten aber zusätzlich S/D-virusinaktivierten Chargen des Folgepräparates A+ im Mittel 43,0 IU/ml. In der einzig verfügbaren Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C wurden 36,0 IU/ml gemessen (Mittelwert aus zwei Bestimmungen). Demgegenüber wurden in den Chargen des zusätzlich nanofiltrierten Präparates C+ im Mittel 28,9 IU/ml gemessen. Das einer Sulfitolyse unterzogene Präparat E erreichte im Mittel 53,2 IU/ml, während das zusätzlich durch Fettalkohole virusinaktivierte Folgeprodukt E+ durchschnittlich 59,6 IU/ml enthielt.

In den nicht modifizierten IVIG wurden, wie bereits erwähnt, höhere Antikörpergehalte nachgewiesen. So wurde in Präparat H ein mittlerer Gehalt von 227,7 IU/ml und in dessen S/D-virusinaktiviertem Nachfolgepräparat H+ 283,6 IU/ml nachgewiesen. Bei Präparat M wurden 185,3 IU/ml und in dessen S/D- und pH4- virusinaktivierten Folgepräparat M+ 226,1 IU/ml gemessen.

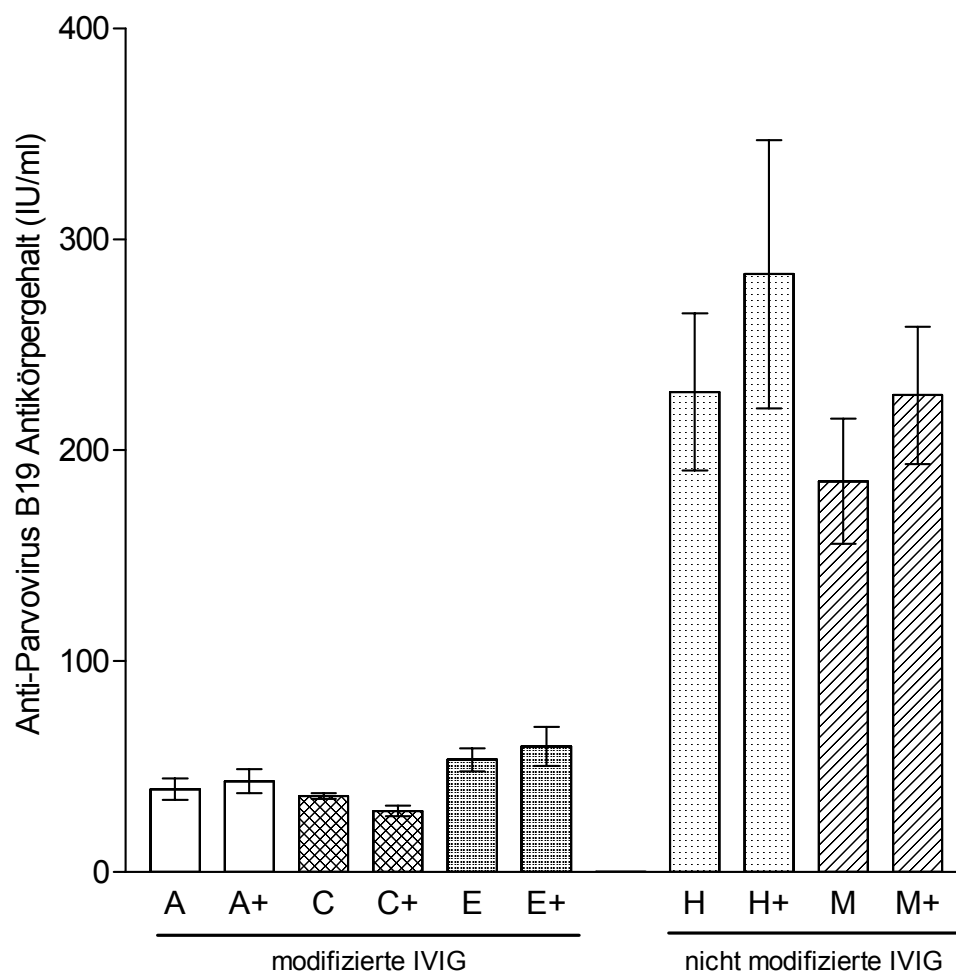


Abbildung 13 Anti-Parvovirus B19-Gehalt in IVIG vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte (Mittelwerte $\pm$ 1 SD).

4.2.2.4 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse aller untersuchten IVIG, die chemisch bzw. enzymatisch modifiziert sind, inklusive der bereits oben beschriebenen Präparatepaare zusammengestellt.

Das aus F(ab)₂-Anteilen bestehenden Präparat B reagierte nicht im verwendeten ELISA-Test.

Das Pepsin- und pH4-behandelte Präparat D wurde in seinen beiden Formulierungen (3% und 6%ig) geprüft. Es wurden je 5 Chargen des 3% bzw. 6%igen Immunglobulins getestet. Um die erhaltenen Werte mit denen der anderen Präparate vergleichen zu können, wurden die Werte auf eine 5%ige Lösung umgerechnet. Danach enthielt das Präparat im Mittel 121,3 IU/ml Anti-Parvovirus B19 Antikörper. Im Vergleich zu anderen modifizierten IVIG besitzt Präparat D die höchste Anti-Parvovirus B19-Aktivität.

Das IgM-angereicherte und mit β -Propiolacton behandelte Präparat F enthielt 56,8 IU/ml.

4.2.2.5 Nicht modifizierte IVIG

In den nicht modifizierten IVIG wurden überwiegend deutlich höhere Anti-Parvovirus B19-Gehalte gemessen, als in der Präparatgruppe der modifizierten IVIG. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der nicht modifizierten IVIG zusammengefasst. Die gemessenen Werte lagen zwischen 75,3 IU/ml (Präparat J) und 283,6 IU/ml (Präparat H+).

In zwei Präparaten wurden deutlich niedrigere Anti-Parvovirus B19-Gehalte gemessen. Es handelt sich hierbei um das bei 60°C virusinaktivierte Präparat J (75,3 IU/ml) und um das Präparat K (80,0 IU/ml). Präparat K ist das nicht mehr β -Propiolacton-behandelte Nachfolgepräparat von Präparat C+ (28,9 IU/ml).

Das Präparat G wird zur Virusinaktivierung einer Hitzebehandlung (60°C, 10 h) unterzogen. Der gemessene Anti-Parvovirus B19-Gehalt betrug im Mittel 147,7 IU/ml. Das ebenfalls hitzebehandelte Präparat I enthielt dagegen einen höheren Gehalt von 202,0 IU/ml. In dem S/D- und pH4-behandelten Präparat L wurden durchschnittlich 206,3 IU/ml nachgewiesen.

Tabelle 18 Anti-Parvovirus B19-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
A	10	39,2	7,1
A+	10	43,0	7,8
B	10	n.n.	n.n.
C	1	36,0	-
C+	10	28,9	2,6
D	10	121,3 ^a	26,9
E	10	53,2	5,5
E+	10	59,6	9,3
F	11	56,8	9,2

n.n.= nicht nachweisbar

^a = umgerechnet auf eine 5%ige Ig-Lösung

Tabelle 19 Anti-Parvovirus B19-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
G	12	147,7	30,2
H	7	227,7	37,3
H+	10	283,6	63,7
I	10	202,0	38,4
J	10	75,3	6,6
K	2	80,0	4,2
L	10	206,3	30,3
M	10	185,3	29,8
M+	12	226,1	32,6

Der Antikörpergehalt gegen Parvovirus B19 in den untersuchten IVIG variierte stark. Um abzuklären, ob dies auf unterschiedliche Antikörpergehalte im Ausgangsmaterial (Plasmapools) zurückzuführen ist, wurden die Antikörpertiter in den zugehörigen Plasmapoolproben mit dem gleichen ELISA-Testsystem bestimmt.

4.2.2.6 Parvovirus B19-Antikörpergehalt in Plasmapoolproben

In allen untersuchten Plasmapools wurden Antikörper gegen Parvovirus B19 nachgewiesen (Tabelle 20 und Tabelle 21). Die gemessenen Einzelwerte lagen im Bereich von min. 19 IU/ml bis max. 67 IU/ml. Das Mittel aller untersuchten Plasmapoolproben lag bei 37 ± 11 IU/ml. Der mittleren Antikörpergehalte der Plasmapools, die zur Herstellung von nicht modifizierten IVIG verwendet wurden lagen zwischen 26 IU/ml und 43 IU/ml. In einem vergleichbaren Bereich lagen auch die Werte der Plasmapools, die zur Herstellung von chemisch oder enzymatisch behandelten IVIG eingesetzt wurden (28 IU/ml bis 50 IU/ml).

Tabelle 20 Parvovirus B19-Antikörpergehalte in Plasmapools zur Herstellung chemisch oder enzymatisch modifizierter IVIG

Endprodukt	Anzahl Plasmapools (n)	Mittelwert (min.-max.) (IU/ml)	mittlere Anreicherung in IVIG (Faktor)
A	2	28 (26-29)	1,4
A+	-	-	-
B	24	39 (21-66)	7,7*
C	-	-	-
C+	7	30 (24-46)	1,0
D	41	40 (26-67)	3,0
E	5	47 (38-54)	1,1
E+	2	48 (44-51)	1,3
F	5	50 (42-54)	1,1

- = kein Probenmaterial zur Messung vorhanden

* = kalkuliert aus einem Messwert des Präparates B aus Tabelle 22

Tabelle 21 Parvovirus B19-Antikörpergehalte in Plasmapools zur Herstellung nicht modifizierter IVIG

Endprodukt	Anzahl Plasmapools (n)	Mittelwert (min.-max.) (IU/ml)	mittlere Anreicherung in IVIG (Faktor)
G	20	43 (26-54)	3,4
H	-	-	-
H+	-	-	-
I	-	-	-
J	-	-	-
K	-	-	-
L	11	26 (19-35)	7,9
M	24	32 (25-42)	5,9
M+	10	29 (22-36)	7,8

- = kein Probenmaterial zur Messung vorhanden

4.2.2.7 Anreicherung von Parvovirus B19-Antikörper in Endprodukten

Die Monographie für IVIG fordert eine mindestens 3-fache Anreicherung eines viralen Antikörpers im Endprodukt gegenüber dem Ausgangsmaterial (Plasmapool). Der Anreicherungsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis der gemessenen Antikörperkonzentration in den Endprodukten zur Antikörperkonzentration in den Ausgangsmaterialien. Zur Berechnung des Anreicherungsfaktors wurden die Mittelwerte der gemessenen IVIG-Chargen eines Präparates durch die Mittelwerte der zugehörigen Plasmapoolproben dividiert.

Die mindestens 3-fache Anreicherung in den Endprodukten wurde nur bei den nicht modifizierten Präparaten erreicht (Tabelle 21). Innerhalb dieser Gruppe ergaben sich Anreicherungsfaktoren von 3,4 (Präparat G) bis 7,9 (Präparat L).

In der Präparatgruppe der chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG wurden deutlich niedrigere Anreicherungsfaktoren berechnet. Es wurden Anreicherungsfaktoren von 1,0 für das β -Propiolacton-behandelte Präparat C+ bis 2,6 für das Pepsin- und pH4-behandelte Präparat D berechnet.

4.2.2.8 Einfluss des verwendeten Sekundärantikörpers auf die Messergebnisse

In Präparat B, welches durch Pepsinverdau aus F(ab)₂-Fragmenten besteht, konnten keine Antikörper gegen Parvovirus B19 nachgewiesen werden (Tabelle 18). In den zur ihrer Herstellung verwendeten Plasmapools wurden dagegen Anti-Parvovirus B19-Antikörper detektiert.

Der Nachweis der an die antigenbeschichtete ELISA-Platte gebundenen Probenantikörper erfolgt über einen gegen den Fc-Bereich humaner IgG gerichteten, enzymgekoppelten Sekundärantikörper. Es wurde geprüft, ob sich durch die Verwendung eines anderen Sekundärantikörpers, der gegen den F(ab)-Bereich humaner IgG gerichtet ist, auch in Präparat B Antikörper gegen das Parvovirus B19 nachweisen lassen.

Um dies zu prüfen, wurde je eine Hälfte der ELISA-Testplatte mit gleichen Proben und Standard beschickt.

Während eine Plattenhälfte mit dem mitgelieferten Sekundärantikörper aus dem Testkit (Anti-Fc) inkubiert wurde, wurde die andere Hälfte mit einem gegen die F(ab)-Region gerichteten Sekundärantikörper (ebenfalls Peroxidase konjugiert) parallel inkubiert.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse aus diesem Versuch. In Präparat B ließen sich durch die Verwendung des gegen den F(ab)-Bereich humanen IgGs gerichteten Sekundärantikörpers F(ab)₂-Antikörper mit Spezifität gegen Parvovirus B19 nachweisen (301 IU/ml). Die Höhe der Aktivität liegt damit im Bereich von Antikörper-Präparationen, die nicht modifiziert wurden.

Bei anderen, parallel mitgetesteten IVIG zeigte sich der Einfluss des Sekundärantikörpers auf das Messergebnis deutlich geringer. Die mit Anti-F(ab)-Sekundärantikörper erhaltenen Werte lagen durchschnittlich etwas höher, als die mit Anti-Fc-Sekundärantikörper erhaltenen Werte. Größere Abweichungen der gemessenen Werte wurden bei Präparat A, D, E+, H+ und I beobachtet, während bei den anderen Präparaten nahezu identische Aktivitäten gemessen wurden (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22 Einfluss des verwendeten Sekundärantikörpers auf die quantitative Bestimmung von Anti-Parvovirus B19 in verschiedenen IVIG-Präparaten (Mittelwerte aus Doppelbestimmung $\pm$ 1 SD)

Präparat	Messwerte bei Verwendung von Sekundärantikörper gegen	
	Anti-Fc (IU/ml)	Anti-F(ab) (IU/ml)
Modifizierte IVIG		
A	64 $\pm$ 0	84 $\pm$ 1
B	nicht nachweisbar	301 $\pm$ 6
C+	39 $\pm$ 0	40 $\pm$ 1
D	162 $\pm$ 1	207 $\pm$ 3
E+	50 $\pm$ 2	70 $\pm$ 0
F	89 $\pm$ 3	83 $\pm$ 9
Nicht modifizierte IVIG		
G	215 $\pm$ 8	221 $\pm$ 8
H+	417 $\pm$ 4	487 $\pm$ 4
I	236 $\pm$ 9	270 $\pm$ 5
L	239 $\pm$ 4	260 $\pm$ 35
M	234 $\pm$ 0	238 $\pm$ 17

4.2.3 Anti-HAV-ELISA

4.2.3.1 Vorversuche zur Quantifizierbarkeit des eingesetzten ELISA

Die Kalibrationskurve wurde durch Verdünnen des 1. Internationalen Standards für anti-HAV Immunglobuline in negativem Kontrollserum erzeugt. Die gewählten Verdünnungsstufen entsprachen 80, 40, 20 und 10 mIU/ml des Standards.

Abbildung 14 zeigt den Verlauf einer typischen Kalibrationskurve des verwendeten Anti-HAV-ELISA nach logarithmischer Transformation der Dosis und der Extinktionswerte. Die mittlere Nachweisgrenze des Anti-HAV-ELISA beträgt ca. 10 mIU/ml. Die Proben wurden so verdünnt, dass die Proben-Extinktionswerte innerhalb des Extinktionswerte der Standardkurve lagen.

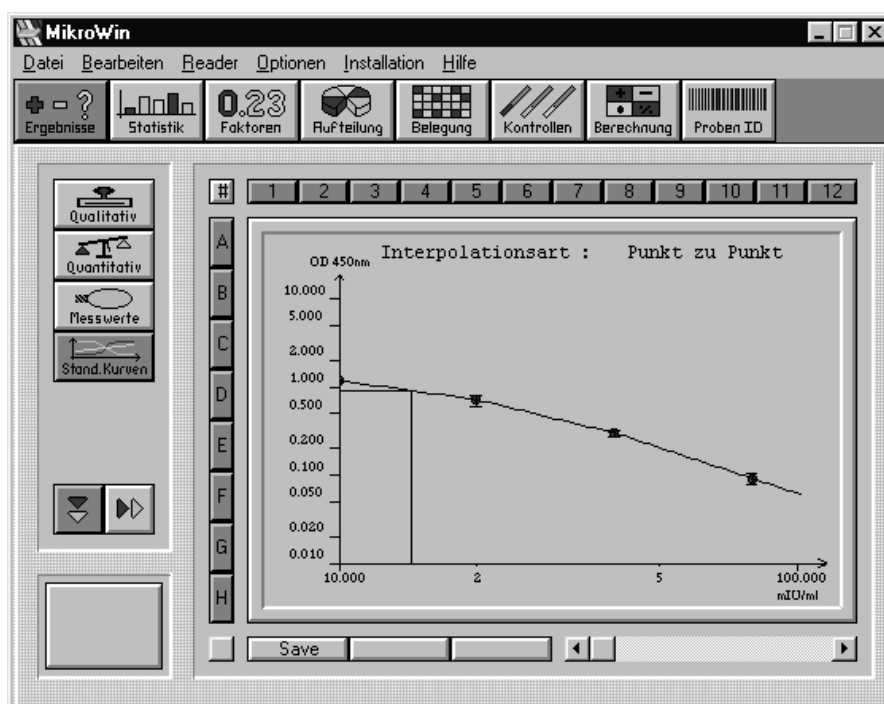


Abbildung 14 Die Abbildung zeigt den repräsentativen Verlauf der Anti-HAV-Standardkurve. Die eingesetzten Konzentrationen des 1. WHO Referenzpräparates für Hepatitis A Immunglobuline entsprachen 80, 40, 20 und 10 mIU/ml. Die Nachweisgrenze wird durch den Schnittpunkt der vertikalen Geraden mit der x-Achse angezeigt (hier 14,3 mIU/ml). Die Balken über und unter den Punkten zeigen die min. und max. gemessenen Extinktionswerte aus den Doppelbestimmungen der Standardverdünnungen an.

4.2.3.2 Anti-HAV-Antikörpergehalt in IVIG

Der Antikörpergehalt gegen HAV in den Präparaten wurde mittels kompetitiven ELISA bestimmt. Dies besitzt den Vorteil, dass auch Antikörper detektiert werden können, deren Fc-Teil modifiziert wurde bzw. nicht mehr vorhanden ist. Voraussetzung ist jedoch, dass der F(ab')₂-Bereich der in den IVIG enthaltenen Anti-HAV-Ak intakt ist, damit diese mit den monoklonalen Anti-HAV-Antikörpern um die Bindungsstellen am HAV-Antigen konkurrieren können.

4.2.3.3 Präparatepaare

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Präparatepaare vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.

Bei dem Trypsin-behandelten Präparat A wurden im Mittel $12,8 \pm 6,3$ IU/ml gemessen. Demgegenüber wurde im S/D-virusinaktivierten Präparat A+ ein signifikant ($p < 0,05$) geringerer Antikörpergehalt von durchschnittlich $7,0 \pm 2,5$ IU/ml bestimmt. Die einzige Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C enthielt 19,8 IU/ml, während in den zusätzlich nanofiltrierten Chargen (C+) im Mittel $34,0 \pm 6,8$ IU/ml bestimmt wurden.

Zwischen den Präparaten E und E+, die beide einer Sulfitolyse unterzogen wurden, bestand hinsichtlich des Anti-HAV-Gehaltes kein statistisch gesicherter Unterschied. Das Präparat E enthielt $18,2 \pm 7,6$ IU/ml Anti-HAV-Antikörper, während das durch Fettalkohole zusätzlich inaktivierte Präparat E+ $13,2 \pm 5,3$ IU/ml enthielt.

Ebenfalls kein Unterschied konnte zwischen den Präparatepaaren H/H+ bzw. M/M+ in der Gruppe der nicht modifizierten IVIG festgestellt werden. Präparat H enthielt durchschnittlich $29,0 \pm 5,0$ IU/ml, während das S/D-inaktivierte Folgepräparat im Mittel $29,7 \pm 11,3$ IU/ml enthielt.

Noch geringer war der Unterschied zwischen den bei pH 4,25 gelagerten IVIG M und M+. Das nicht inaktivierte Vorgängerpräparat M enthielt durchschnittlich $34,6 \pm 13,1$ IU/ml, das S/D-inaktivierte Präparat M+ $34,7 \pm 7,0$ IU/ml.

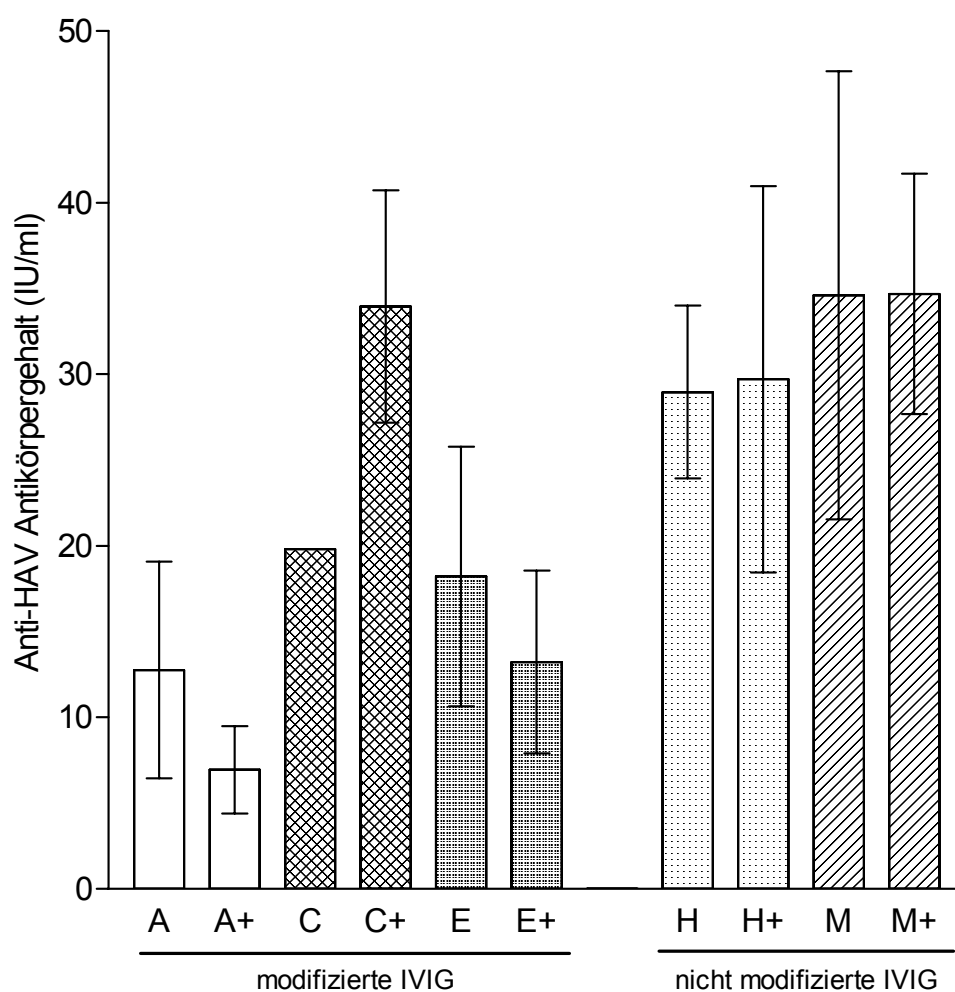


Abbildung 15 Anti-HAV-Antikörpergehalt in IVIG vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte (Mittelwerte $\pm$ 1 SD)

Der Anti-HAV-Antikörpergehalt wurde zu Vergleichszwecken auch in anderen IVIG-Präparaten gemessen. Die Ergebnisse sind, zusammen mit den bereits oben beschriebenen, in Tabelle 23 und Tabelle 24 aufgeführt.

4.2.3.4 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Das Präparat B ist ein für 10 h bei 60°C hitzeinaktiviertes, aus F(ab)₂-Anteilen bestehendes IVIG. An diesem Präparat zeigte sich der Vorteil des kompetitiven ELISA-Systems. Die Bestimmung war hier trotz der fehlenden Fc-Region möglich. Die untersuchten Chargen des Präparates B enthielten durchschnittlich $25,0 \pm 13,6$ IU/ml, wobei eine relativ große Streuung der Werte beobachtet wurde (VK% = 54,6).

Das Pepsin- und pH4-behandelte Präparat D enthielt im Mittel $28,9 \pm 8,1$ IU/ml, während in dem IgM-enthaltenen und β -Propiolacton-behandelten Präparat F durchschnittlich $24,7 \pm 9,7$ IU/ml gemessen wurden.

4.2.3.5 Nicht modifizierte IVIG

Mit $41,0 \pm 19,0$ IU/ml wurden in dem hitzeinaktivierten (10 h, 60°C) Präparat G die durchschnittlich höchsten Anti-HAV-Antikörpergehalte gemessen. Die Variabilität innerhalb der untersuchten Chargen war auch bei diesem Präparat relativ groß. Ein vergleichsweise geringen Antikörpergehalt besaß das ebenfalls hitzeinaktivierte Präparat J ($16,5 \pm 2,1$ IU/ml).

Den niedrigsten Anti-HAV-Antikörpergehalt ($6,6 \pm 0,8$ IU/ml) enthielt Präparat I, welches zu 50% aus Albumin besteht und ohne Inaktivierungsschritte hergestellt wird.

Präparat K ist das nicht mehr β -Propiolacton-behandelte Nachfolgeprodukt des Präparates C+. In den beiden untersuchten Chargen von Präparat K wurden im Mittel $36,5 \pm 3,7$ IU/ml gemessen. Der Antikörpergehalt gegen HAV unterscheidet sich jedoch nicht vom β -Propiolacton-behandelten Präparat C+ ($34,0 \pm 6,8$ IU/ml).

Im S/D- und pH4-behandelten Präparat L wurden die zweithöchsten Werte mit $38,3 \pm 9,6$ IU/ml gemessen.

Tabelle 23 Anti-HAV-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
A	10	12,8	6,3
A+	10	7,0	2,5
B	10	25,0	13,6
C	1	19,8	
C+	10	34,0	6,8
D	10	28,9	8,1
E	10	18,2	7,6
E+	10	13,2	5,3
F	10	24,7	9,7

Tabelle 24 Anti-HAV-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
G	12	41,0	19,0
H	7	29,0	5,0
H+	10	29,7	11,3
I	10	6,6	0,9
J	10	16,5	2,1
K	2	36,5	3,7
L	10	38,3	9,6
M	10	34,6	13,1
M+	12	34,7	6,9

4.2.3.6 Anti-HAV-Antikörpergehalt in Plasmapools

Nach der gültigen Arzneimittelmonographie für IVIG wird eine mindestens 3-fache Anreicherung der Antikörper in den Präparaten gegenüber dem Ausgangsmaterial gefordert. Um die Anreicherungsfaktoren zu bestimmen, wurden die zu den Chargen zugehörigen Plasmapoolproben – soweit sie verfügbar waren – mit dem gleichen ELISA auf ihren Anti-HAV-Antikörpergehalt hin untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 und Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 25 Anti-HAV-Antikörpergehalte in Plasmapools zur Herstellung chemisch oder enzymatisch modifizierter IVIG

Endprodukt	getestete Plasmapools (n)	Mittelwert (min.-max.) (IU/ml)	mittlere Anreicherung in IVIG (Faktor)
A	2	2,0 (1,6 – 2,5)	6,4
A+	-	-	-
B	24	2,1 (1,1 - 4,8)	11,9
C	-	-	-
C+	7	6,0 (4,6 - 6,9)	5,7
D	41	3,5 (1,4 - 5,0)	8,3
E	5	1,8 (0,8 - 2,2)	10,1
E+	2	2,8 (1,5 - 4,1)	4,7
F	5	4,0 (0,8 - 6,6)	6,2

- = kein Probenmaterial zur Messung vorhanden

Tabelle 26 Anti-HAV-Antikörpergehalte in Plasmapools zur Herstellung nicht modifizierter IVIG

Endprodukt	getestete Plasmapools (n)	Mittelwert (min.-max.) (IU/ml)	mittlere Anreicherung in IVIG (Faktor)
G	20	2,4 (1,0 - 4,8)	17,0
H	-	-	-
H+	-	-	-
I	-	-	-
J	-	-	-
K	-	-	-
L	11	2,9 (1,5 - 5,1)	13,2
M	24	2,4 (1,1 - 4,2)	14,4
M+	9	2,0 (1,5 - 2,5)	17,4

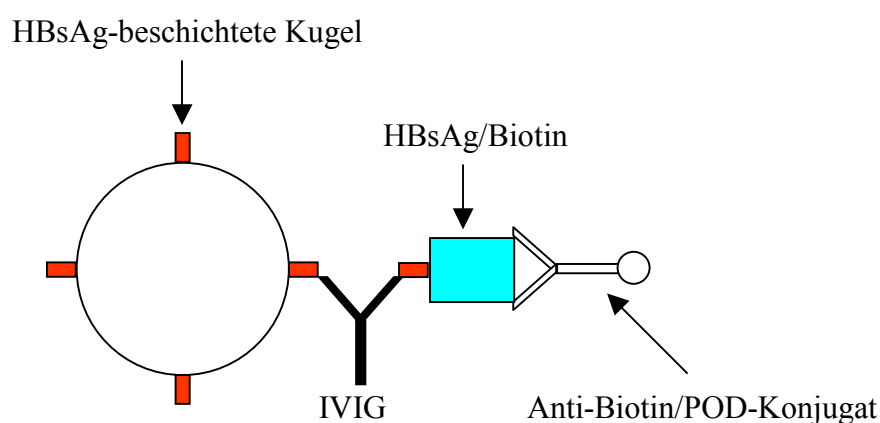
- = kein Probenmaterial zur Messung vorhanden

In allen untersuchten Plasmapoolproben wurden Anti-HAV-Antikörper nachgewiesen. Die Antikörpergehalte aller untersuchten Plasmapoolproben lagen im Bereich von min. 0,8 IU/ml bis max. 6,9 IU/ml. Das arithmetische Mittel aller untersuchten Plasmapoolproben betrug $2,9 \pm 1,3$ IU/ml.

Die in der Monographie für IVIG geforderte 3-fache Anreicherung eines viralen Antikörpers im Endprodukt gegenüber dem Ausgangsmaterial (Plasmapool) war in allen untersuchten IVIG-Präparaten gegeben (Tabelle 25 und Tabelle 26).

4.2.4 Anti-HBsAg-EIA

Die Anforderungen der Monographie für intravenöse Immunglobuline schreiben einen Anti-HBsAg Mindestgehalt von 0,5 Internationalen Einheiten pro Gramm Immunglobulin (IU/g Ig) vor. Der Einfluss zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte auf diesen Parameter wurde untersucht. Das angewandte Bestimmungsverfahren beruht auf der Inkubation HBsAg-beschichteter Polystyrolkugeln mit den Proben. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt hierbei über eine weitere Inkubation mit Biotin-markiertem HBsAg sowie Anti-Biotin-Antikörpern (Peroxidase konjugiert) entsprechend folgendem Schema:



4.2.4.1 Präparatepaare

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Anti-HBsAg Bestimmung vor und nach Einführung von virusinaktivierenden Herstellungsschritten.

Das Trypsin-behandelte Präparat A enthielt im Mittel 7,1 IU/g Ig, sein S/D-inaktiviertes Folgepräparat A+ im Mittel 7,8 IU/g Ig. Die einzig noch verfügbare Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C enthielt 1,8 IU/g Ig, während in zusätzlich nanofiltrierte Chargen (C+) durchschnittlich 9,0 IU/g Ig bestimmt wurden. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bestand zwischen den sulfonierten Präparaten E bzw. E+. Präparat E enthielt 0,8 IU/g Ig, während das Fettalkohol-behandelte Präparat E+ 1,4 IU/g Ig enthielt.

Kein Unterschied wurde zwischen Präparat H (12,7 IU/g Ig) und dem S/D-behandelten Folgepräparat H+ (14,3 IU/g Ig) festgestellt.

In dem sauren Präparat M und dessen S/D-inaktivierten Folgepräparat M+ wurden durchschnittlich 18,5 bzw. 15,0 IU/g Ig gemessen. Die Differenz der Mittelwerte war statistisch nicht signifikant.

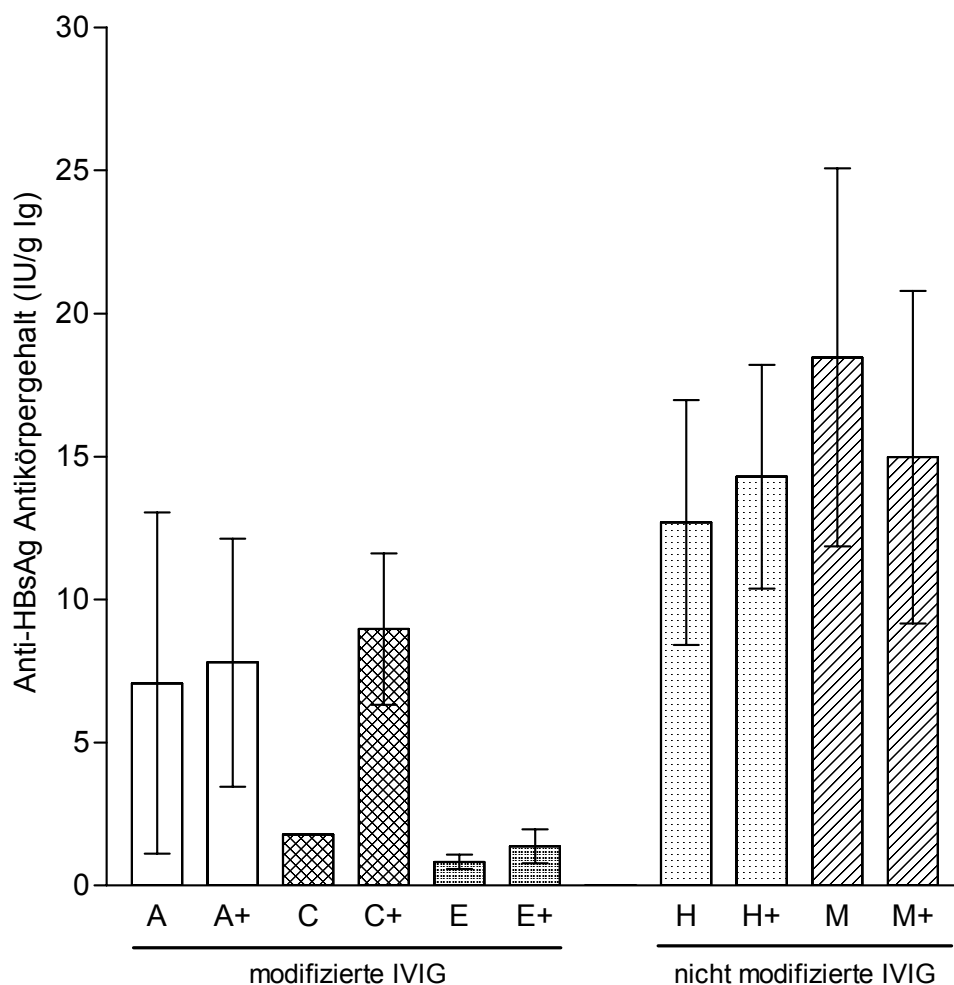


Abbildung 16 Anti-HBsAg Antikörpergehalt verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte (Mittelwerte $\pm$ 1 SD)

Vergleichend wurden weitere Präparate, bei denen kein direkter Vergleich möglich war getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 aufgeführt.

4.2.4.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Die bei 60°C hitzeinaktivierten, aus F(ab)₂-Fragmenten bestehenden Chargen des Präparat B enthielten im Durchschnitt 21,8 IU/g Ig, wobei der Gehalt der Chargen stark variierte (7,8 IU/g Ig bis 67,0 IU/g Ig).

Am stärksten streuten die Werte bei dem IgM-haltigen Präparat F (VK = 108 %). Es wurden Anti-HBsAg-Gehalte zwischen 16,4 bis 508,9 IU/g Ig gemessen. Das Mittel lag bei 177,4 IU/g Ig.

Das Pepsin- und pH 4-behandelte Präparat D enthielt durchschnittlich 9,2 IU/g Ig.

4.2.4.3 Nicht modifizierte IVIG

Mit Ausnahme des Präparates I und K lagen die Anti-HBsAg-Gehalte bei den nicht modifizierten IVIG in einer Größenordnung von etwa 13 – 18 IU/g Ig.

Die niedrigsten Konzentrationen in der Gruppe der nicht modifizierten IVIG wurden mit 2,1 IU/g Ig in dem S/D-inaktivierten und mit Albumin angereicherten Präparat I gemessen. Die S/D-Behandlung scheint für den niedrigen Gehalt aber nicht verantwortlich zu sein, da das ebenfalls S/D-inaktivierte Präparat L einen höheren Anti-HBSAg-Gehalt besaß (14,2 IU/g Ig).

Die höchste Konzentration enthielt Präparat K mit durchschnittlich 27,4 IU/g Ig.

Das durch Hitzebehandlung virusinaktivierte Präparat G enthielt 17,2 IU/g Ig, das ebenfalls hitzeinaktivierte Präparat J durchschnittlich 12,9 IU/g Ig.

Tabelle 27 Anti-HBsAg-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/g Ig)	Standardabweichung (IU/g Ig)
A	10	7,1	6,0
A+	10	7,8	4,3
B	10	21,8	22,7
C	1	1,8	-
C+	10	9,0	2,6
D	10	9,2	1,8
E	10	0,8	0,3
E+	10	1,4	0,6
F	9	177,4	192,1

Tabelle 28 Anti-HBsAg-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/g Ig)	Standardabweichung (IU/g Ig)
G	12	17,2	16,8
H	7	12,7	4,3
H+	10	14,3	3,9
I	10	2,1	0,5
J	10	12,9	5,9
K	2	27,4	7,1
L	10	14,2	4,6
M	10	18,5	6,6
M+	12	15,0	5,8

4.2.5 Anti-VZV-ELISA

Die Bestimmung des Anti-VZV-Antikörpergehaltes erfolgte mittels eines ELISA-Tests, der Antikörper vom Typ IgG nachweist. Die Bestimmung beruht auf der Bindung der Probenantikörper an mit VZV-Antigen beschichteten Mikrotiterplatten. Die Detektion der spezifisch gebundenen Probenantikörper erfolgt hierbei über ein Antikörper-Peroxidasekonjugat, welches gegen den Fc-Teil humaner IgG Antikörper gerichtet ist. Die Bestimmung ist daher abhängig von der Anwesenheit und Integrität des Fc-Teils der Probenantikörper. Proben vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte wurden parallel auf der gleichen ELISA-Platte getestet.

4.2.5.1 Präparatepaare

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Anti-VZV-Bestimmung vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.

Das Trypsin-behandelte Präparat A enthielt durchschnittlich 5,3 IU/ml, während in dem S/D-inaktivierten Präparat A+ im Mittel 6,1 IU/ml gemessen wurden.

Die einzig verfügbare Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C wurde in allen durchgeführten Anti-VZV-ELISA-Testen wiederholt ($n = 11$) bestimmt, um die Wiederholpräzision des Testes zu prüfen. Der Mittelwert betrug 4,5 IU/ml $\pm$ 1,6 IU/ml (VK = 35,5%). Das nanofiltrierte Folgepräparat C+ enthielt durchschnittlich 3,1 IU/ml.

Zwischen dem sulfonierten Präparat E und dessen durch Fettalkoholbehandlung zusätzlich virusinaktivierten Folgepräparat E+ konnte statistisch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. In Präparat E wurden im Mittel 3,4 IU/ml und in Präparat E+ 3,7 IU/ml nachgewiesen.

Die nicht modifizierten Präparatepaare wiesen gegenüber den chemisch oder enzymatisch modifizierten Produkten höhere Antikörpergehalte gegen VZV auf.

Die S/D-behandelten Folgepräparate der Präparatepaare H/ H+ und M/ M+ besaßen im Mittel geringfügig höhere Anti-VZV-Antikörpergehalte. Die Differenz der Mittelwerte bei Präparat M (8,2 IU/ml) und dessen Folgepräparat M+ (9,3 IU/ml) war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

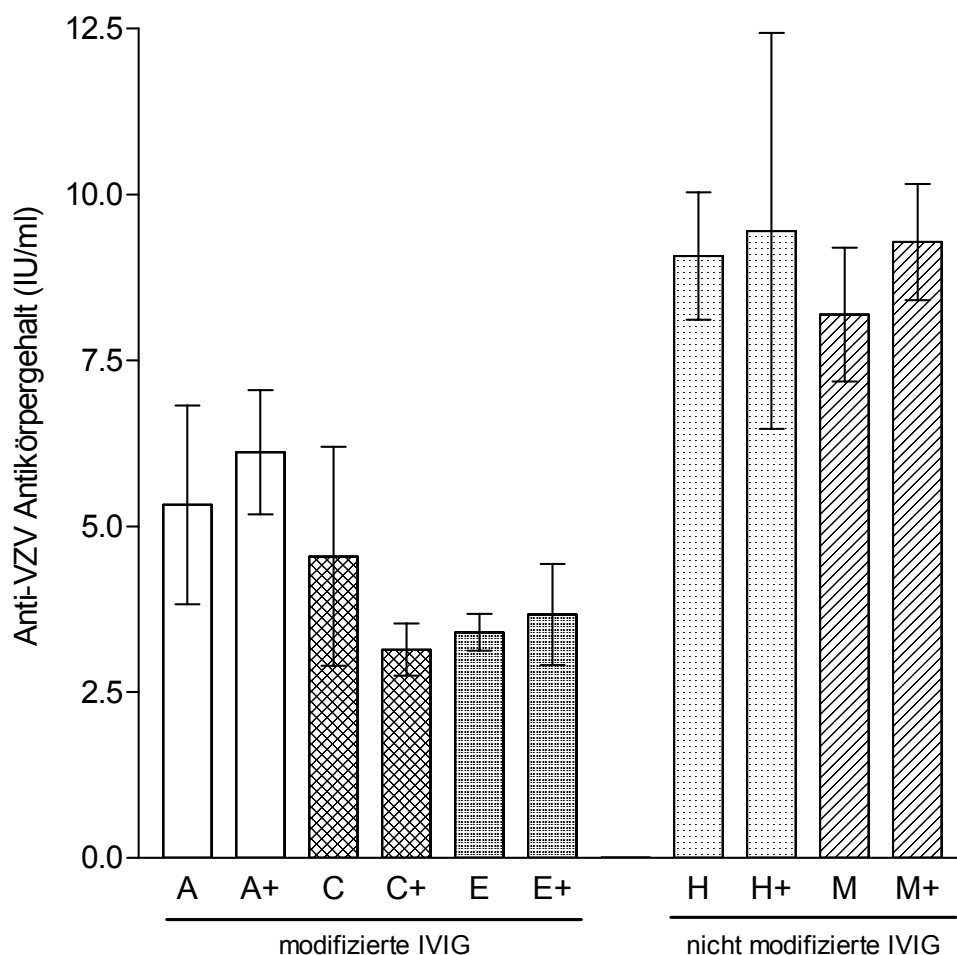


Abbildung 17 Anti-VZV-Antikörpergehalte verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte (Mittelwerte $\pm$ 1 SD)

Bei weiteren IVIG-Präparaten wurden der Anti-VZV-Gehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 zusammengefasst.

4.2.5.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Die Gruppe der chemisch oder enzymatisch behandelten IVIG zeigte auch bei der Bestimmung der Anti-VZV-Antikörper durchschnittlich niedrigere Messwerte im Vergleich zur Gruppe der nicht modifizierten IVIG.

Ein Nachweis von Antikörpern gegen VZV im Präparat B war mit dem ELISA nicht möglich, da das Präparat B aufgrund der Pepsinbehandlung aus F(ab)₂-Fragmenten besteht. Die nach Herstellerangaben schonende Herstellung, die einen Pepsin- und pH 4-Schritt enthält, zeigte sich bei Präparat D anhand einer Aktivität von 4,8 IU/ml.

Das β -Propiolacton-behandelte und mit IgM angereicherte Präparat F enthielt im Mittel 5,0 IU/ml.

4.2.5.3 Nicht modifizierte IVIG

In den beiden hitzebehandelten Präparaten G und J wurden durchschnittlich 10,5 IU/ml bzw. 7,2 IU/ml gemessen. In dem S/D-inaktivierten und zu 50% aus Albumin bestehendem Präparat I wurden 6,3 IU/ml nachgewiesen. Das ebenfalls S/D-inaktivierte Präparat L enthielt im Mittel 8,1 IU/ml.

Das Präparat K enthielt durchschnittlich 5,0 IU/ml im Vergleich zu 3,1 IU/ml des β -Propiolacton-behandelten Präparates C⁺. Im Unterschied zu Präparat C⁺ wird Präparat K ohne β -Propiolacton-Behandlung hergestellt, wird aber chromatographisch gereinigt.

Tabelle 29 Anti-VZV-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
A	10	5,3	1,5
A+	10	6,1	0,9
B	10	n.n	-
C	(11)	4,5	1,6
C+	10	3,1	0,4
D	10	4,8	0,6
E	10	3,4	0,3
E+	10	3,7	0,8
F	10	5,0	2,8

() = Wiederholungsprüfungen an einer einzigen Charge

n.n = im verwendeten Testsystem nicht nachweisbar

Tabelle 30 Anti-VZV-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
G	12	10,5	1,7
H	7	9,1	1,0
H+	10	9,5	3,0
I	10	6,3	0,3
J	10	7,2	1,5
K	2	5,0	0,7
L	10	8,1	2,7
M	10	8,2	1,0
M+	12	9,3	0,9

4.2.6 Anti-CMV-ELISA

Um den Einfluss zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte auf die Antikörperaktivität gegen CMV in IVIG zu bestimmen, wurde der Anti-CMV-Gehalt (IgG) mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die Proben, die direkt miteinander verglichen werden konnten, wurden paarweise auf der gleichen ELISA-Platte getestet. Die Bestimmung erfolgte durch Einpunktquantifizierung nach der α -Methode. Hierzu wurde eine einzige Verdünnungsstufe der Proben in vierfachem Ansatz auf den Platten aufgetragen. Der Mittelwert der gemessenen Extinktionen wurde zur weiteren Berechnung des Titters nach der α -Methode verwendet. Durch das Mitführen eines Referenzmaterials des Paul-Ehrlich-Institutes (Referenz-CMV-IgG, 120 E/ml von 1996) erfolgte die Umrechnung der erhaltenen Titer in (PEI) E/ml.

4.2.6.1 Präparatepaare

Insgesamt zeigte der Vergleich zwischen modifizierten und nicht modifizierten Präparatepaaren eine deutlich reduzierte Aktivität bei den modifizierten Präparaten. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Anti-CMV-Bestimmung vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.

In den S/D-virusinaktivierten Chargen des Präparates A+ wurde ein signifikant höherer Anti-CMV-Antikörpergehalt gemessen, als in Chargen des nicht inaktivierten Vorgängerpräparates A. Das Präparat A enthielt im Mittel 10,7 E/ml, während in Präparat A+ durchschnittlich 17,2 E/ml gemessen wurden.

Ein anderes Ergebnis zeigte sich bei dem β -Propiolacton-behandelten Präparatepaar C/C+. Zur Messung stand nur noch eine Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C zur Verfügung. In dieser Charge wurden 16,5 E/ml (Mittel aus 10 Bestimmungen) nachgewiesen. Vergleichsweise wurden 10 verschiedene Chargen des zusätzlich nanofiltrierten Folgepräparates C+ untersucht. In diesen Chargen wurden dagegen im Mittel nur 6,5 E/ml gemessen.

Auch bei dem sulfonierten Präparatepaar E/E+ wurde ein niedrigerer Anti-CMV-Gehalt nach Einführung des virusinaktivierenden Herstellungsschrittes (Behandlung mit Fettalkoholen) beobachtet.

Die Chargen vor der Inaktivierung enthielten durchschnittlich 10,8 E/ml, während nach Einführung der Fettalkoholbehandlung nur 7,9 E/ml gemessen wurden.

Bei den nicht modifizierten Präparatepaaren lagen die gemessenen Werte nach der zusätzlichen Virusinaktivierung im Mittel etwas höher. Präparat H enthielt im Mittel 33,5 E/ml, das S/D-behandelte Präparat H+ dagegen 34,6 E/ml.

In Präparat M wurden durchschnittlich 53,8 E/ml, dagegen in dem S/D-inaktivierten Präparat M+ 32,8 E/ml gemessen. Der Unterschied im mittleren Anti-CMV-Gehalt erklärt sich aus dem Umstand, dass in 2 von 10 untersuchten Chargen des Präparates M deutlich höhere Anti-CMV-Gehalte bestimmt wurden (166,5 E/ml und 164,7 E/ml). Eine Testwiederholung mit beiden Chargen bestätigte die Ergebnisse. Um auszuschließen, dass die hohen Anti-CMV-Werte dieser Chargen durch einen zu hohen Proteingehalt der Proben bedingt sein könnten, wurde deren Proteingehalt bestimmt. Die Proben enthielten 52,1 mg/ml bzw. 50,0 mg/ml Gesamtprotein und lagen damit innerhalb der vom Hersteller angegebenen Spezifikation (47,5-52,5 mg/ml). Die Durchsicht der Chargen-Begleitdokumente ergab, dass bei der Herstellung zumindest einer der beiden Chargen Plasmapools verwendet wurden, die auch für die Produktion von spezifischem Anti-CMV-Immunglobulin verwendet wurden. Für die zweite Charge lagen diesbezüglich keine Informationen vor.

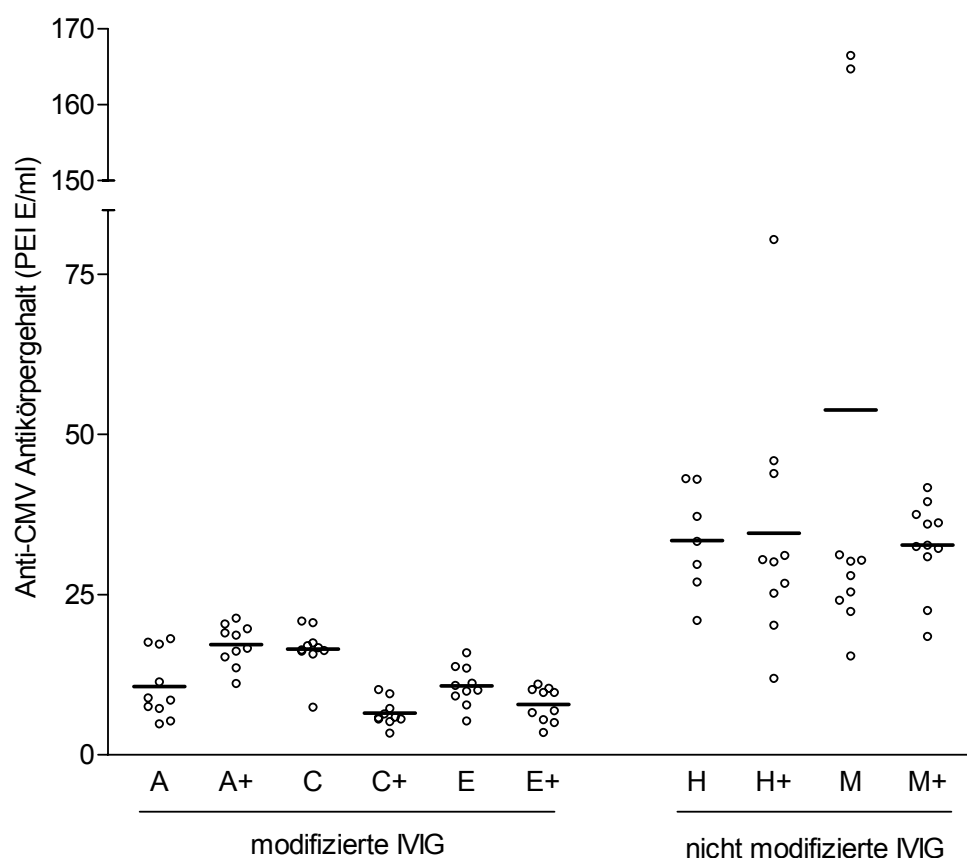


Abbildung 18 Anti-CMV-Antikörpergehalt verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte. Die horizontalen, schwarzen Balken stellen Mittelwerte dar. Bei Präparat C handelt es sich um die Ergebnisse bei wiederholter Bestimmung (n = 10) der einzig verfügbaren Charge.

Weitere Präparate, bei denen kein direkter Vergleich vor und nach Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte möglich war, wurden zu Vergleichszwecken auf ihren Anti-CMV-Antikörpergehalt hin bestimmt. Die Ergebnisse sind zusammen mit den bereits oben beschriebenen in Tabelle 31 und Tabelle 32 zusammengefasst.

4.2.6.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

In dem Pepsin-gespaltenen und aus F(ab)₂-Fragmenten bestehenden Präparat B konnten mit dem verwendeten ELISA-Test keine Anti-CMV-Antikörper nachgewiesen werden.

Das bei pH4 und unter milder Pepsineinwirkung (9 ± 3 h, bei ca. 37°C) hergestellte Präparat D enthielt im Mittel 17,0 E/ml. In dem β -Propiolacton-behandelten, IgM-haltigen Präparat F wurden durchschnittlich 31,6 E/ml gemessen.

4.2.6.3 Nicht modifizierte IVIG

Das durch Hitzebehandlung (10 Std. Inkubation bei 60°C) zusätzlich virusinaktivierte Präparat G enthielt im Mittel 39,1 E/ml. Vergleichend hierzu wurden im ebenfalls hitzeinaktivierten Präparat J 25,4 E/ml nachgewiesen.

In den beiden zur Verfügung stehenden Chargen des Präparates K wurden durchschnittlich 9,1 E/ml gemessen. Präparat K ist das nicht mehr β -Propiolacton-behandelte Nachfolgeprodukt von Präparat C+ (6,5 E/ml).

Die S/D-virusinaktivierten Präparate I und L enthielten vergleichbar hohe Anti-CMV-Gehalte (24,5 E/ml bzw. 26,1 E/ml).

Tabelle 31 Anti-CMV-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (PEI E/ml)	Standardabweichung (PEI E/ml)
A	10	10,7	5,2
A+	10	17,2	3,2
B	10	n.n.	-
C	(10)	16,5	3,7
C+	10	6,5	2,0
D	10	17,0	4,6
E	10	10,8	3,1
E+	10	7,9	2,7
F	10	31,6	22,8

() = Wiederholungsprüfungen an einer Charge

n.n = im verwendeten Testsystem nicht nachweisbar

grau = Präparatepaare

Tabelle 32 Anti-CMV-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (PEI E/ml)	Standardabweichung (PEI E/ml)
G	12	39,1	9,5
H	7	33,5	8,3
H+	10	34,6	19,0
I	10	24,5	4,7
J	10	25,4	6,7
K	2	9,1	2,7
L	10	26,1	9,7
M	10	53,8	59,1
M+	11	32,7	6,9

4.3 Hämolyse-Hemmungsteste (HHT)

4.3.1 Anti-Staphylolysin-HHT

Um den Einfluss der Virusinaktivierungsschritte auf Antikörper zu untersuchen, die gegen bakterielle Antigene gerichtet sind, wurde der Anti-Staphylolysin-Gehalt in den IVIG mittels Hämolyse-Hemmungstest bestimmt. Als Bestimmungsmethode bietet der HHT gegenüber dem ELISA-Test den Vorteil, dass die Antikörper von allen Seiten an das zugesetzte Staphylolysin binden können, und dass die toxinneutralisierende Wirkung der Antikörper direkt sichtbar wird. Darüber hinaus bietet die Bestimmungsmethode den Vorteil, dass auch die neutralisierende Wirkung von F(ab)₂-Fragmenten bestimmt werden kann.

4.3.1.1 Präparatepaare

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Anti-Staphylolysin-Bestimmung vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte, bei denen ein direkter Vergleich möglich war. Zum Zeitpunkt der Testdurchführung lag das Nachfolgepräparat A+ noch nicht vor, weshalb es in der Abbildung fehlt.

Zwischen dem Präparat E und dem mit Fettalkoholen behandelten Nachfolgepräparat E+ konnte kein Unterschied im Neutralisationstiter gemessen werden. In allen 10 untersuchten Chargen des sulfonierten Präparates E wurden 2,7 IU/ml Anti-Staphylolysin nachgewiesen. Bei dem Nachfolgepräparat E+ wurden in 8 Chargen ebenfalls 2,7 IU/ml, bei zwei weiteren Chargen 4,0 IU/ml gemessen.

Bei der einzig zur Messung verfügbaren Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C wurden 2,7 IU/ml gemessen. Die zusätzlich nanonfiltrierte Charge des Nachfolgepräparates C+ enthielt im Mittel ebenfalls 2,7 IU/ml, wobei die Einzelwerte verschiedener Chargen zwischen 2,0 bis 4,0 IU/ml lagen.

Durchschnittlich höhere Werte wurden wiederum bei den nicht modifizierten Präparatepaaren gemessen. In 5 der 7 untersuchten Chargen des Präparates H wurden 4,0 IU/ml gemessen, 2 Chargen enthielten niedrigere Antikörpergehalte (2,0 und 3,0 IU/ml).

Im Vergleich hierzu wurden in 9 Chargen des zusätzlich S/D-behandelten Präparates H+ 4,0 IU/ml gemessen. Eine Charge enthielt 5,3 IU/ml. Die S/D-Behandlung beeinflusste damit nicht die neutralisierende Wirkung der Anti-Staphylolysin-Antikörper.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei dem Vergleich der bei pH 4,25 gelagerten Präparate M bzw. M⁺ gefunden. In 8 von 10 Chargen Präparat M wurden 4,0 IU/ml, in 2 Chargen 2,7 IU/ml gemessen. Bei dem S/D-virusinaktivierten Nachfolgepräparat M⁺ enthielten dagegen alle 12 Chargen 4,0 IU/ml.

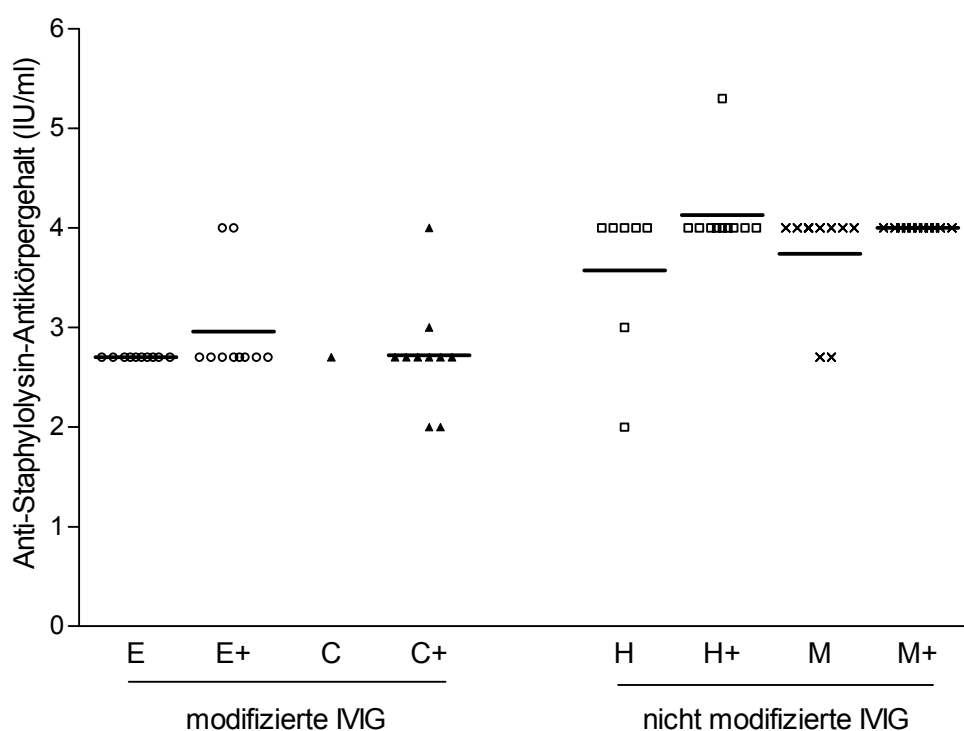


Abbildung 19 Anti-Staphylolysin-Gehalt verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte. Die horizontalen, schwarzen Balken stellen Mittelwerte dar.

4.3.1.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

In 5 der Trypsin-behandelten Chargen des Präparates A wurden 4,0 IU/ml, in weiteren 5 Chargen 5,3 IU/ml gemessen. Diese Werte lagen im Bereich der Ergebnisse, wie sie auch bei nicht modifizierten IVIG beobachtet werden konnten. Zum Zeitpunkt der Testdurchführung lag das Nachfolgepräparat A+ noch nicht vor.

Die höchsten Anti-Staphylolysin-Gehalte wurden in dem Pepsin-behandelten und aus F(ab)₂-Fragmenten bestehenden Präparat B gemessen. Von den 10 untersuchten Chargen enthielten 5 Chargen 5,3 IU/ml, weitere 5 Chargen enthielten 8,0 IU/ml. Das Ergebnis zeigt auch, dass die toxinneutralisierende Eigenschaft der Ak durch die F(ab)-Region vermittelt wird und nicht vom Fc-Teil abhängig ist.

Bei dem unter milder Pepsin/pH 4-Behandlung hergestellten Präparat D wurden jeweils 5 Chargen der 30 bzw. 60 mg/ml Immunglobulin enthaltenen Proben untersucht. In allen 5 der 30 mg/ml Ig enthaltenen Chargen wurden 2,7 IU/ml gemessen, während 4 der 5 Chargen mit 60 mg/ml 5,3 IU/ml enthielten. Eine Charge enthielt dagegen nur 2,7 IU/ml.

Das IgM-angereicherte und β -Propiolacton-behandelte Präparat F erreichte durchschnittlich hohe Werte. In 3 Chargen wurden 2,7 IU/ml, in weiteren 7 Chargen 4,0 IU/ml nachgewiesen. Im Vergleich zu den ebenfalls β -Propiolacton-behandelten Präparaten C bzw. C+ des gleichen Herstellers enthalten die IgM-angereicherten Chargen ein durchschnittlich höheren Anti-Staphylolysin-Gehalt.

4.3.1.3 Nicht modifizierte IVIG

Insgesamt wurden bei den nicht modifizierten IVIG höhere Anti-Staphylolysin-Gehalte nachgewiesen. 74 von 81 (91%) aller nicht modifizierten IVIG-Chargen besaßen einen Anti-Staphylolysin-Gehalt von $\geq 4,0$ IU/ml. Bei den chemisch oder enzymatisch behandelten IVIG enthielten dagegen nur 34 von 71 (48%) der untersuchten Chargen Antikörpergehalte über 4,0 IU/ml.

Das hitzeinaktivierte Präparat G enthielt in 7 von 12 untersuchten Chargen 4,0 IU/ml, in weiteren 5 Chargen wurden 5,3 IU/ml gemessen.

Die Aktivität des zu 50% aus Albumin bestehenden Präparates I (S/D-inaktiviert) unterschied sich nicht von anderen nicht modifizierter IVIG. In 9 von 10 Chargen wurden 4,0 IU/ml gemessen, in einer weiteren Charge 5,3 IU/ml.

Das ebenfalls S/D-behandelte Präparat L enthielt 3 Chargen die vergleichsweise niedrige Antikörpergehalte aufwiesen (2,0 und 3,0 IU/ml). Dagegen wurden in 7 weiteren Chargen 4,0 IU/ml gemessen.

Tabelle 33 Anti-Staphylolysin-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Anti-Staphylolysin-Gehalt (IU/ml)					
		2,0	2,7	3,0	4,0	5,3	8,0
A	10				5	5	
B	10					5	5
C	1		1				
C+	10	2	6	1	1		
D (30 mg/ml)	5		5				
D (60 mg/ml)	5		1			4	
E	10		10				
E+	10		8		2		
F	10		3		7		

Tabelle 34 Anti-Staphylolysin-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Anti-Staphylolysin-Gehalt (IU/ml)					
		2,0	2,7	3,0	4,0	5,3	8,0
G	12				7	5	
H	7	1		1	5		
H+	10				9	1	
I	10				9	1	
J	10				7	2	1
L	10	1		2	7		
M	10		2		8		
M+	12				12		

4.3.2 Anti-Streptolysin-HHT

Als weiteren Antikörper gegen ein bakterielles Antigen wurde der Anti-Streptolysin-Gehalt der IVIG-Präparate mittels HHT bestimmt.

4.3.2.1 Präparatepaare

Die Ergebnisse der Präparatepaare sind in Abbildung 20 vergleichend dargestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung standen keine Chargen des zusätzlich virusinaktivierten Nachfolgepräparates A+ zur Verfügung.

Die einzig verfügbare Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C enthielt 600 IU/ml Anti-Streptolysin-Antikörper. Der Anti-Streptolysin-Gehalt in Chargen des nanofiltrierten Folgepräparates C+ lag im Bereich von min. 300 IU/ml bis max. 600 IU/ml, im Mittel bei 490 IU/ml. Von 10 untersuchten Chargen des Präparates C+ enthielten 5 Chargen ebenfalls 600 IU/ml, wie dies auch bei der nicht nanofiltrierten Vergleichs-Charge gemessen werden konnte. Die Daten des Präparates C+ zeigen, dass zwischen individuellen Chargen des Produktes Unterschiede im Antikörpergehalt vorkommen. Aufgrund eines einzigen Messwertes des Vorgängerpräparates C lässt sich daher nicht ableiten, ob die zusätzliche Nanofiltration bei Präparat C+ den Anti-Streptolysin-Gehalt beeinflusst.

Von allen untersuchten Immunglobulinen wiesen die durch S-Sulfonierung chemisch modifizierten Präparate E und E+ die niedrigsten Aktivitäten auf. Im Mittel wurde bei Präparat E 385 IU/ml, bei dem zusätzlich durch Fettalkohol virusinaktivierten Präparat E+ 345 IU/ml gemessen. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, variiert auch bei diesen Präparaten der Anti-Streptolysin-Gehalt von Charge zu Charge. Der durchschnittlich etwas niedrigere Antikörpergehalt bei den virusinaktivierten Chargen war statistisch jedoch nicht signifikant.

In Präparat H wurden in allen untersuchten Chargen (n=7) 800 IU/ml gemessen. Im Vergleich hierzu wurden in den S/D-behandelten Chargen des Präparates H+ durchschnittlich 760 IU/ml nachgewiesen. Höhere Gehalte (900 IU/ml) wurden in 2 der 10 untersuchten Chargen bestimmt, während in 3 weiteren Chargen 600 IU/ml festgestellt wurden.

Bei den Anti-Streptolysin-Gehalten der sauren Präparate M und M+ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den S/D-behandelten Chargen. In 10 untersuchten Chargen des Präparates M wurden im Mittel 500 IU/ml gemessen, wobei 9 von 10 Chargen im Bereich von 300 IU/ml bis 600 IU/ml lagen, eine Charge enthielt 1200 IU/ml. In den S/D-behandelten Chargen des Präparates M+ wurden dagegen mit 750 IU/ml ein durchschnittlich höherer Anti-Streptolysin-Gehalt nachgewiesen. Die niedrigsten Gehalte lagen bei 600 IU/ml (7 Chargen), während in 2 Chargen 1250 IU/ml bestimmt wurden. Weitere drei Chargen enthielten 800 IU/ml.

4.3.2.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Die Ergebnisse der Anti-Streptolysin-Bestimmung bei chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG sind in Tabelle 35 zusammengestellt.

Das aus F(ab)₂-Anteilen bestehende und durch Hitzebehandlung virusinaktivierte Präparat B zeigte in diesem Testsystem die höchste Anti-Streptolysin-Aktivität aller untersuchten IVIG. Der durchschnittliche Gehalt in 10 untersuchten Chargen betrug 1110 IU/ml. In 7 Chargen wurden 1200 IU/ml und in 3 Chargen 900 IU/ml gemessen.

Von dem unter milder Pepsin/pH 4-Behandlung hergestellten Präparat D wurden insgesamt 10 Chargen untersucht, davon jeweils 5 Chargen der 3% bzw. 6%igen Formulierung. Bei den 3%igen Chargen wurden im Mittel 500 IU/ml und bei den 6%igen Chargen durchschnittlich 780 IU/ml Anti-Streptolysin-Antikörper nachgewiesen. Um diese Werte mit den üblicherweise 5%igen IVIG vergleichen zu können, wurden die Anti-Streptolysin-Gehalte auf einen 5%igen Proteingehalt umgerechnet. Danach enthält das Präparat D durchschnittlich 774 ± 224 IU/ml. Diese Werte liegen damit in Aktivitätsbereichen, wie sie auch von nicht modifizierten Präparaten erreicht wurden.

Das zu Vergleichszwecken mitgeführte, IgM-angereicherte und β -Propiolacton-behandelte Präparat F enthielt im Mittel 640 IU/ml.

4.3.2.3 Nicht modifizierte IVIG

Die Ergebnisse der Anti-Streptolysin-Bestimmung bei nicht modifizierten IVIG sind in Tabelle 36 zusammengestellt.

Das durch eine Hitzebehandlung virusinaktivierte Präparat G enthielt in 12 untersuchten Chargen durchschnittlich 754 IU/ml. Die gemessenen Einzelwerte lagen im Bereich zwischen 400 bis 1200 IU/ml. In dem ebenfalls hitzeinaktivierten Präparat J lag das Mittel bei 1080 IU/ml, wobei min. 800 IU/ml und max. 1200 IU/ml in den untersuchten Chargen gemessen wurden. Ebenfalls hitzeinaktiviert ist Präparat K, das als nicht modifiziertes Nachfolgepräparat von Präparat C+ zugelassen werden soll. Die Messung einer Charge ergab einen Wert von 600 IU/ml.

Zu den S/D-virusinaktivierten Präparaten gehört Präparat I, welches zu 50% aus Albumin besteht. In diesem Präparat wurden im Mittel 700 IU/ml bestimmt, wobei Werte zwischen 450 bis 1200 IU/ml gemessen wurden. Das ebenfalls S/D- und zusätzlich pH4-behandelte Präparat L enthielt durchschnittlich 770 IU/ml (600 bis 1200 IU/ml). Die zusätzliche Inkubation bei pH4 führt somit nicht zu einer reduzierten Anti-Streptolysin-Aktivität.

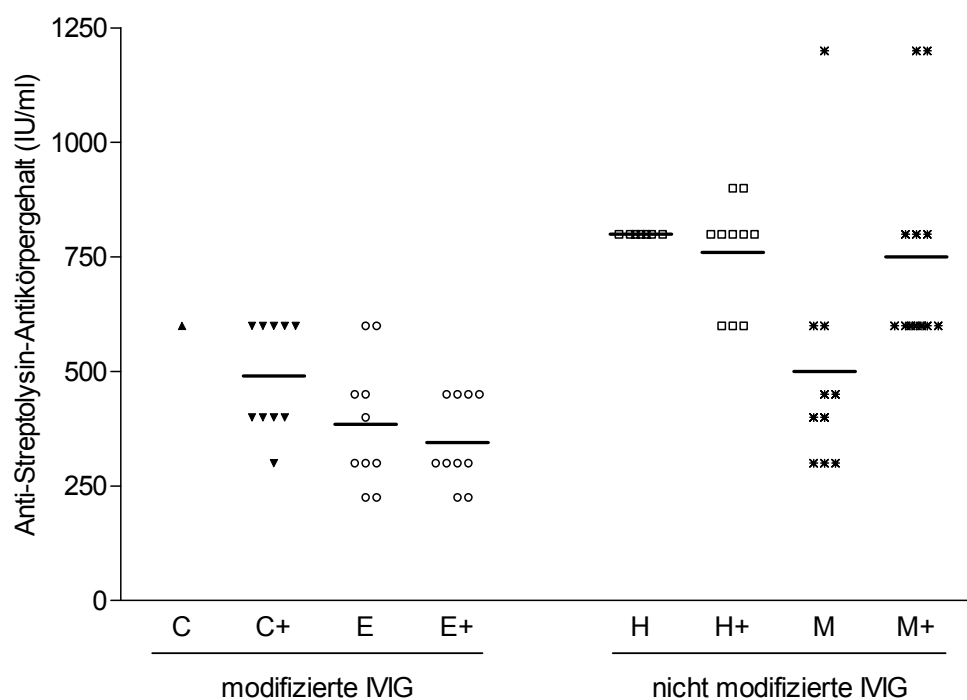


Abbildung 20 Anti-Streptolysin-Antikörpergehalt vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte. Dargestellt sind die Messwerte der untersuchten Proben, sowie die arithmetischen Mittelwerte (schwarze Balken).

Tabelle 35 Anti-Streptolysin-Gehalte in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
A	10	680	103
A+	n.d.		
B	10	1110	145
C	1	600	
C+	10	490	120
D (30 mg/ml)	5	500	162
D (60 mg/ml)	5	780	164
E	10	385	139
E+	10	345	95
F	10	640	227

n.d. = nicht durchgeführt

grau = Präparatepaare

Tabelle 36 Anti-Streptolysin-Gehalte in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (IU/ml)	Standardabweichung (IU/ml)
G	12	754	292
H	7	800	0
H+	10	760	117
I	10	700	230
J	10	1080	193
K	1	600	
L	10	770	189
M	10	500	270
M+	10	750	228

grau = Präparatepaare

4.4 Hämagglutinations-Hemmungstest (HAHT)

4.4.1 Anti-Röteln-HAHT

Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch Verdünnen der Proben in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2. Das gleichzeitige Mitführen eines dem Testkit beigelegten Standardserums mit deklariertem Antikörpergehalt ermöglichte die Umrechnung der erhaltenen Verdünnungsstufen (Titer) in IU/ml.

Die meisten IVIG-Proben wurden mit einer Charge des Testkits bestimmt, deren mitgeliefertes Standardserum eine Aktivität von 19,0 IU/ml besaß. Die Präparate C, H und J wurden dagegen mit einem Testkit bestimmt, dessen mitgeliefertes Standardserum eine Aktivität von nur 13,1 IU/ml aufwies. Der geringe Aktivitätsunterschied beider Standardseren bedingte, dass in der Regel beide Standards im HAHT einen Titer von 1:32 erreichten. Jedoch sind die Ergebnisse in IU/ml, trotz gleichen Titers unterschiedlich. In Tabelle 38 und Tabelle 39 werden daher sowohl die durchschnittlich erreichten Titer, als auch die berechneten Aktivitäten der Proben in IU/ml angegeben.

4.4.1.1 Präparatepaare

Die Ergebnisse der Präparatepaare sind in Abbildung 21 dargestellt. Es wurden je 10 Chargen des Präparates A bzw. A+ untersucht. Das geometrische Mittel ergab für Präparat A einen Titer von 1261. In dem S/D-behandelten Folgepräparat A+ wurde ein durchschnittlicher Titer von 1097 erreicht. In der Regel besaßen die Chargen einen Titer von 1024, wie aus Abbildung 21 zu entnehmen ist. Die S/D-Behandlung führte nicht zu einer signifikanten Änderung im Anti-Röteln-Gehalt.

Die einzig verfügbare Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C wurde in zwei Untersuchungen bestimmt. Es wurden ein Titer von 512 bzw. 2048 gemessen. Im Gegensatz hierzu enthielt das zusätzlich nanofiltrierte Präparat C+ einen durchschnittlichen Titer von 1024.

Bei den sulfonierten Präparaten E und E+ wurden Titer gemessen, die in der Regel eine Titerstufe niedriger lagen. Die zusätzlich eingeführte Behandlung mit Fettalkoholen bei Präparat E+ bewirkte aber keine signifikante Änderung im Anti-Röteln-Gehalt.

Für das Präparatepaar H/H⁺ wurde ein mittlerer Titer von 1024 (Präparat H) bzw. 1911 für das S/D-behandelte Präparat H⁺ gemessen. Die Bestimmung erfolgte jedoch mit unterschiedlichen Testkit-Chargen. Um abzuklären, inwieweit die Proben tatsächlich differieren, wurden je 4 Chargen des alten und neuen Präparates gemeinsam auf einer Testplatte untersucht. Das Ergebnis zeigt Tabelle 37. Danach ergab sich kein Unterschied zwischen den Präparaten vor und nach Einführung der S/D-Behandlung.

Tabelle 37 Anti-Röteln-Titer der Präparate H und H⁺ bei Prüfung auf gleicher Testplatte.

Charge	Präparat H (Titer)	Präparat H ⁺ (Titer)
1	1024	1024
2	1024	1024
3	1024	1024
4	1024	1024

Ebenfalls kein Unterschied im Antikörpergehalt gegen das Röteln-Virus wurde zwischen den Präparaten M und M⁺ festgestellt. Präparat M enthielt einen durchschnittlichen Titer von 1106 (n=10), während alle untersuchten Chargen des S/D-virusinaktivierten Folgepräparates einen Titer von 1024 (n=12) besaßen.

4.4.1.2 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Alle untersuchten Chargen (n=10) des hitzeinaktivierten und aus F(ab)₂-Anteilen bestehenden Präparates B erreichten einen Titer von 1024.

Das unter milder Pepsin/pH 4-Behandlung hergestellte Präparat D erreichte Titer von 512 bei der 3%igen Formulierung, bei der 6%igen wurden Titer von 1024 erreicht. Wurden die Titer auf eine 5%ige Proteinkonzentration umgerechnet, so ergab sich ein Titer von 853. In dem IgM-angereicherten und β -Propiolacton-behandelten Präparat F wurde bei allen untersuchten Chargen ein Titer von 512 gemessen.

Tabelle 38 Anti-Röteln-Gehalt in chemisch oder enzymatisch modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	geom. Mittel (Titer)	Gehalt (IU/ml)	verwendeter Standard (IU/ml)
A	10	1261	790	19,0
A+	10	1097	1216	19,0
B	10	1024	608	19,0
C	1	1024*	524*	13,1
C+	7	1024	608	19,1
D (30 mg/ml)	4	512	304	19,0
D (60 mg/ml)	4	1024	608	19,0
E	10	549	334	19,0
E+	10	630	395	19,0
F	9	512	304	19,0

* = Werte aus Doppelbestimmung

Tabelle 39 Anti-Röteln-Gehalt in nicht modifizierten IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	geom. Mittel (Titer)	Gehalt (IU/ml)	verwendeter Standard (IU/ml)
G	12	1024	633	19,0
H	7	1024	419	13,1
H+	10	1911	1155	19,0
I	10	2048	1216	19,0
J	10	588	252	13,1
K	n.d.			
L	10	955	578	19,0
M	9	1106	676	19,0
M+	12	1024	608	19,0

grau = Präparatepaare

n.d. = nicht durchgeführt

4.5 Nachweis viraler Nukleinsäure in IVIG

4.5.1 Parvovirus B 19-PCR

Mittels nested PCR wurden die Präparate und – soweit verfügbar – die für ihre Herstellung verwendeten Plasmapools auf Parvovirus B19 DNA untersucht. Die Extraktion/Aufreinigung der DNA erfolgte aus 200 µl Probenmaterial, wie unter Material und Methoden (3.4.1.2) beschrieben. Amplifiziert wurde ein konservierter Genabschnitt der viralen DNA, der für das Nichtstrukturprotein NS-1 kodiert. Mit den eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaaren wurden PCR-Produkte von 347 bp nach der 1. Amplifikation bzw. 209 bp nach der 2. Amplifikation (nested) bei positiven Proben erhalten (siehe Abbildung 22).

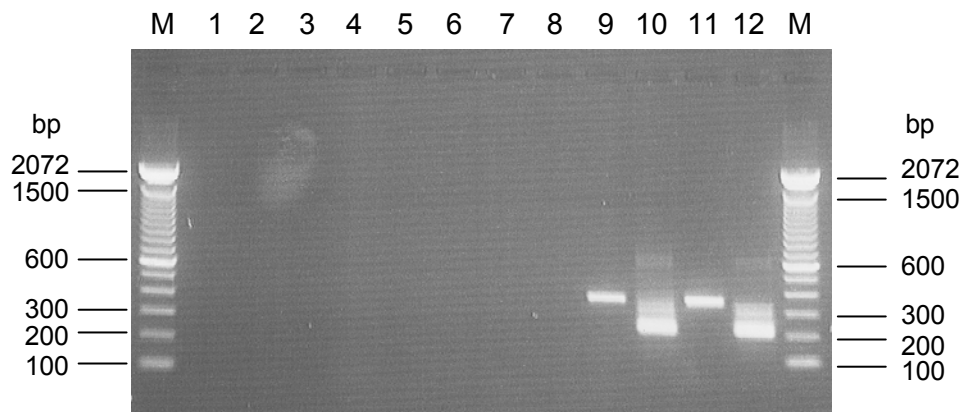


Abbildung 22 Parvovirus B19 PCR. Die PCR-Produkte der als Positiv-Kontrollen mitgeführten Plasmapools besitzen nach der 1. Amplifikation eine Größe von 347 bp (Spur 9 + 11). Das Produkt der 2. Amplifikation (nested PCR) besitzt eine Größe von 209 bp (Spur 10 + 12). Spur 1-4 zwei Chargen des Präparates A, Spur 5 + 6 DEPC-H₂O, Spur 7 + 8 negativer Plasmapool. M = Größenmarker. Die Analyse der PCR-Produkte (10 µl/Tasche) erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel (Ethidiumbromid-Markierung).

4.5.1.1 Parvovirus B19 DNA in Plasmapoolproben und Endprodukten

Die getesteten Plasmapoolproben stammten aus den noch vorhandenen Rückstellproben, die dem Paul-Ehrlich-Institut zur Plasmapooltestung eingereicht wurden. Es wurden dabei nur Plasmapools getestet, die aufgrund der Chargendokumentation für die Herstellung der zu untersuchenden Endprodukt-Chargen (IVIG) verwendet wurden. Nicht für jede getestete IVIG-Charge waren Rückstellproben der Plasmapools vorhanden. Tabelle 40 enthält die Ergebnisse der Plasmapooltestung und der daraus hergestellten Endprodukte. Auf eine Zuordnung einzelner Plasmapoolproben zu den zugehörigen Endprodukt-Chargen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Insgesamt wurden 152 Endprodukt-Chargen untersucht. In keiner der getesteten IVIG konnte Parvovirus B19 DNA nachgewiesen werden. Demgegenüber reagierten jedoch 64 von 135 (47 %) aller untersuchten Plasmapoolproben positiv.

Für Präparat A standen nur zwei Plasmapoolproben für die Untersuchung zur Verfügung, eine reagierte in der PCR positiv. Die vom Hersteller verwendeten Plasmen stammten aus den USA, Deutschland, Schweden und Österreich. Eine Aufschlüsselung nach Herkunftsland ist nicht möglich, da mehrere Plasmen aus unterschiedlichen Ländern zu einem Plasmapool vereinigt werden. Trotz der Verwendung eines positiven Ausgangsmaterials konnte in den 10 Chargen des Endproduktes keine Parvovirus B19 DNA nachgewiesen werden.

Für das Präparat B konnten 24 Plasmapoolproben untersucht werden. 10 von 24 Plasmapools reagierten positiv. Die daraus hergestellten IVIG-Chargen waren jedoch negativ. Der Hersteller bezieht seine Plasmen aus Deutschland, USA und Österreich.

Die einzig verfügbare Charge des β -Propiolacton-behandelten Präparates C war negativ. Für diese Charge existierten keine Plasma-Rückstellproben mehr. Präparat F wird jedoch vom selben Hersteller produziert. Das Präparat unterscheidet von Präparat C sich durch einen erhöhten IgM-Anteil. Eine von fünf untersuchten Plasmapoolproben des Präparates F reagierte positiv, die daraus hergestellten IVIG-Chargen waren negativ. Für die Produktion der IVIG bezieht der Hersteller Plasmen aus Deutschland, Österreich, USA und Belgien.

Bei Präparat D werden die Plasmen aus Deutschland bezogen, wobei zur Herstellung einer Charge Endprodukt in der Regel mehrere Plasmapools verwendet werden. Daraus resultiert die relativ hohe Zahl von Rückstellproben. Von 41 untersuchten Plasmapools reagierten 22 positiv. Auch hier konnte keine virale DNA in den zugehörigen Endprodukten nachgewiesen werden.

Für die Herstellung der sulfonierten Präparate E bzw. E+ werden Plasmen aus Deutschland, USA und Österreich verwandt. 3 der 7 getesteten Plasmapools reagierten in der PCR positiv. Die daraus hergestellten IVIG-Chargen waren negativ.

Alle nicht modifizierten IVIG reagierten in der Parvovirus B19 PCR ebenfalls negativ. Plasmapoolproben standen nur von Präparat G, L und M zur Untersuchung zur Verfügung. Die für Präparat G verwandten Plasmen stammten dabei ausschließlich aus den USA. In 6 von 18 untersuchten Plasmapools wurde Parvovirus B19 DNA nachgewiesen.

Die Plasmapoolproben für das S/D-behandelte Präparat L wurden auf Anfrage freundlicherweise vom Hersteller für die Untersuchung bereitgestellt. 9 der 11 untersuchten Plasmapools reagierten positiv. Die daraus hergestellten IVIG-Chargen reagierten alle negativ. Der Hersteller bezieht die Plasmen aus Deutschland, USA, Österreich und Schweden.

Präparat I wird ausschließlich aus schwedischen Plasmen hergestellt. In den 10 untersuchten Endprodukt-Chargen konnte keine Parvovirus B19 DNA nachgewiesen werden. Plasmapools waren für diese Chargen nicht mehr verfügbar.

Das Präparat M wird ausschließlich aus US-Plasmen hergestellt. In 11 der 20 untersuchten Plasmapoolproben ließ sich Parvovirus B19 DNA nachweisen. Die DNA fand sich jedoch nicht in den daraus hergestellten IVIG-Chargen wieder. Da das Präparat M noch ohne zusätzliche Virusinaktivierungsschritte hergestellt wurde, erfolgt eine Reduktion oder Elimination von Parvovirus B19 anscheinend während des Fraktionierungsverfahrens. In dem zusätzlich S/D-behandelten Nachfolgepräparat M+ ließ sich ebenfalls keine virale DNA nachweisen.

Tabelle 40 Parvovirus B19 DNA in Plasmapools und den daraus hergestellten Endprodukten

Präparat	Plasmapools getestet (n)	PCR positiv		Endprodukte getestet (n)	PCR positiv	
		Anzahl (n)	Anteil (%)		Anzahl (n)	Anteil (%)
Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG						
A	2	1	50	10	0	0
A+	n.d.			10	0	0
B	24	10	42	10	0	0
C	n.d.			1	0	0
D	41	22	54	10	0	0
E	7	3	43	10	0	0
E+				10	0	0
F	5	1	20	10	0	0
Nicht modifizierte IVIG						
G	18	6	33	12	0	0
H	n.d.			7	0	0
H+	n.d.			10	0	0
I	n.d.			10	0	0
J	n.d.			10	0	0
L	11	9	82	10	0	0
M	20	11	55	10	0	0
M+	n.d.			12	0	0

n.d.= nicht durchgeführt

4.5.1.2 Ausschluss PCR hemmender Substanzen in Endprodukten

Um auszuschließen, dass die durchweg negativen Ergebnisse bei IVIG durch PCR-hemmende Faktoren oder Substanzen in den Endprodukten bedingt waren, wurden die Endprodukt-Chargen mit Parvovirus B19 DNA der Positiv-Kontrolle versetzt. Anschließend erfolgte die Extraktion und Amplifikation wie beschrieben. Alle mit Positiv-Kontrolle versetzten Endprodukt-Chargen reagierten daraufhin positiv (Abbildung 23). Ein PCR-hemmender Effekt kann daher ausgeschlossen werden.

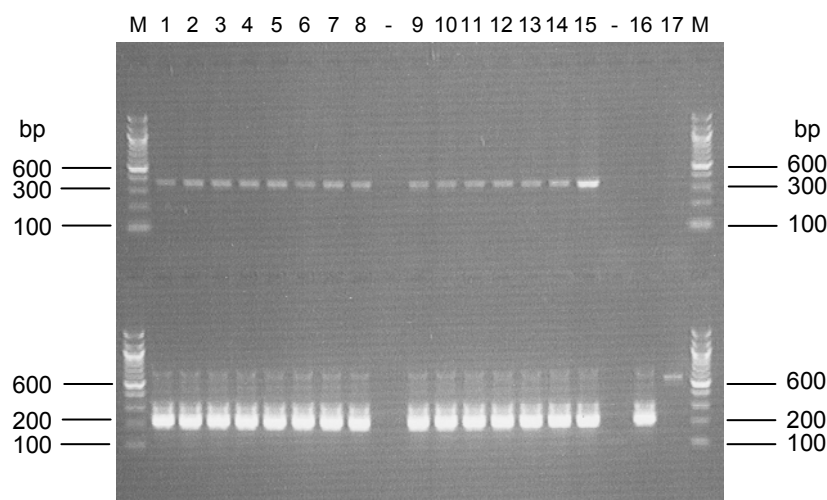


Abbildung 23 Ausschluss PCR-hemmender Faktoren: Eine PCR-positive Plasmapoolprobe wurde im Verhältnis 1:40 mit verschiedenen Endprodukten (IVIG) verdünnt, und anschließend die PCR wie beschrieben durchgeführt. Die zugesetzte Parvovirus B19 DNA konnte in allen Präparaten amplifiziert werden. PCR-Produkte (10 µl/Tasche) aus der 1. Amplifikation wurden auf der oberen Gelhälfte, die der 2. Amplifikation (nested PCR) auf der unteren Gelhälfte aufgetragen. M = Grössenmarker, Spur 1 = Präparat G, Spur 2 = Präparat A, Spur 3 + 4 = Präparat H bzw. H+, Spur 5 = Präparat B, Spur 6 = Präparat I, Spur 7 = Präparat C+, Spur 8 = Präparat F, Spur 9 + 10 = Präparat M bzw. M+, Spur 11 = Präparat D, Spur 12 + 13 = Präparat E bzw. E+, Spur 14 = Präparat J, Spur 15 = PCR-positive Plasmapoolprobe ohne IVIG, Spur 16 = B19 DNA PCR-Referenz (NIBSC 97/542), Spur 17 = PCR-Kontrolle (DEPC-H₂O), Spur - = frei

4.6 Funktionelle Prüfung der IVIG

Die Antikörpergehaltsbestimmungen und die dort angewandten serologischen Testverfahren (ELISA, EIA, etc.) dienen hauptsächlich zum Vergleich der Bindungsfähigkeit der untersuchten IVIG-Präparationen, für die die F(ab)-Region der Antikörper verantwortlich ist. Die wichtigsten Effektorfunktionen von Antikörpern, wie die Komplementaktivierung auf klassischem Weg oder die Bindung an zellständige Fc-Rezeptoren werden dagegen über den Fc-Teil der Antikörper vermittelt. Zur Prüfung der Fc-Funktion der untersuchten IVIG wurden zwei unterschiedliche Testverfahren angewandt: Zum einen der für IVIG im DAB vorgeschriebene Fc-Funktionstest, zum anderen ein Fc-Rezeptor-Bindungstest, mit dem die Bindungseigenschaft der Ak mit Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden kann (RAMASAMY, 2000).

Die Fähigkeit der IVIG die Phagozytose von Bakterien zu beschleunigen, wurde in einem Phagozytoseversuch untersucht und vergleichend dargestellt. Die Eigenschaft der Antikörper, die Aufnahme von Bakterien durch Granulozyten zu fördern, setzt neben einem intakten F(ab)₂-Bereich für die Bindung an die Bakterienoberfläche auch einen intakten Fc-Bereich für die Bindung an Fc-Rezeptoren von Granulozyten voraus.

4.6.1 Fc-Funktionstest

Der zeitliche Verlauf der komplementvermittelten Hämolyse mit Rötelnantigen beschichteter Erythrozyten wurde mittels Extinktionsmessung bei 541 nm aufgezeichnet. Als Referenzantikörper diente das im DAB vorgeschriebene biologische Referenzmaterial (BRP). Dessen Aktivität wird als Fc-Index angegeben und wird gleich 100% gesetzt. Die Aktivitäten der untersuchten Präparate wurden dazu vergleichend bestimmt. Nach der Arzneibuchmonographie für IVIG sollen die Präparate eine Mindestaktivität von 60% des Referenzpräparates besitzen. Die Durchführung des Tests und die Berechnung der angegebenen Fc-Indices erfolgte wie unter Material und Methode (3.5.1) beschrieben.

4.6.1.1 Hämolyskurven

Die Zugabe des als Komplementquelle dienenden Meerschweinchen-Serums führte in Abhängigkeit der Fc-Aktivität der Präparate zu einer unterschiedlich stark verlaufenden Hämolysen der mit Rötelnantigen beschichteten Erythrozyten. Die Hämolyskurven zeigten bei allen untersuchten Präparaten, die Antikörper mit Fc-Teilen besitzen, einen Kurvenverlauf, wie in Abbildung 24 exemplarisch dargestellt. Die Abbildung zeigt die Absorptionswerte eines nicht modifizierten IVIG (Präparat H+) im Vergleich zu den Absorptionswerten des Referenzantikörpers sowie einer Negativ-Kontrolle (Ansatz ohne Antikörper).

Präparat B führte zu keiner Hämolysen, da der Fc-Teil der Antikörper durch die Behandlung mit Pepsin abgespalten wurde. Die Absorptionswerte der Probe verliefen daher parallel zur Negativ-Kontrolle (Abbildung 25).

Innerhalb der ersten 30 Sekunden zeigte sich in allen Versuchsansätzen zunächst eine Absorptionsabnahme, die durch den initialen Mischvorgang von Serum als Komplementquelle und der Erythrozytensuspension in den Messküvetten bedingt ist. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, bildet sich erst 30 Sekunden nach Zugabe des Meerschweinchen-Serums ein stabiles Plateau aus. Die unterschiedlich hohen Absorptionswerte zu Beginn des Messvorganges haben jedoch keinen Einfluss auf den berechneten Fc-Index, da dieser aus dem Verhältnis der max. erhaltenen relativen Steigungen zwischen zwei Messpunkten berechnet wird. Darüber hinaus enthält die Vorschrift des DAB Rechenschritte zur Korrektur der Steigungswerte (siehe 3.5.1.7).

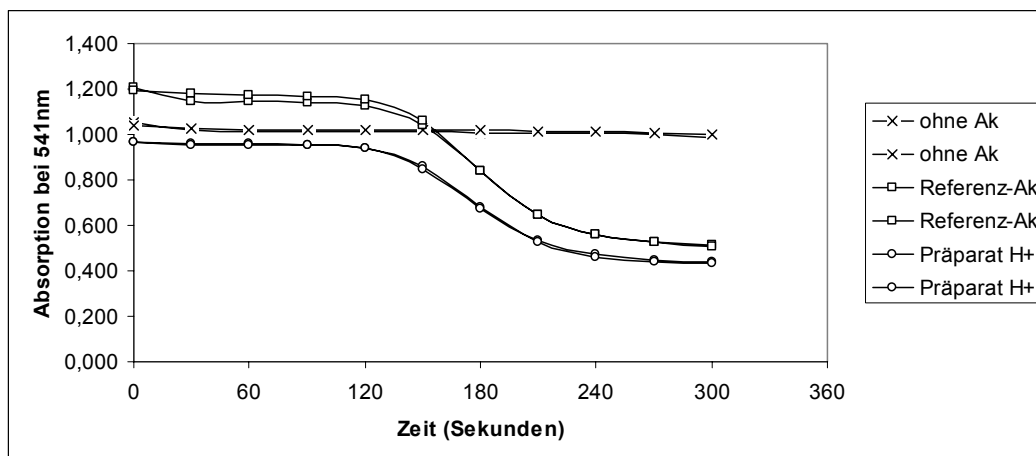


Abbildung 24 Hämolysekurve eines nicht modifizierten IVIG mit intakter Fc-Funktion (Präparat H+). Die Hämolysekurve verläuft annähernd parallel zur Kurve des Referenzantikörpers. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung getestet.

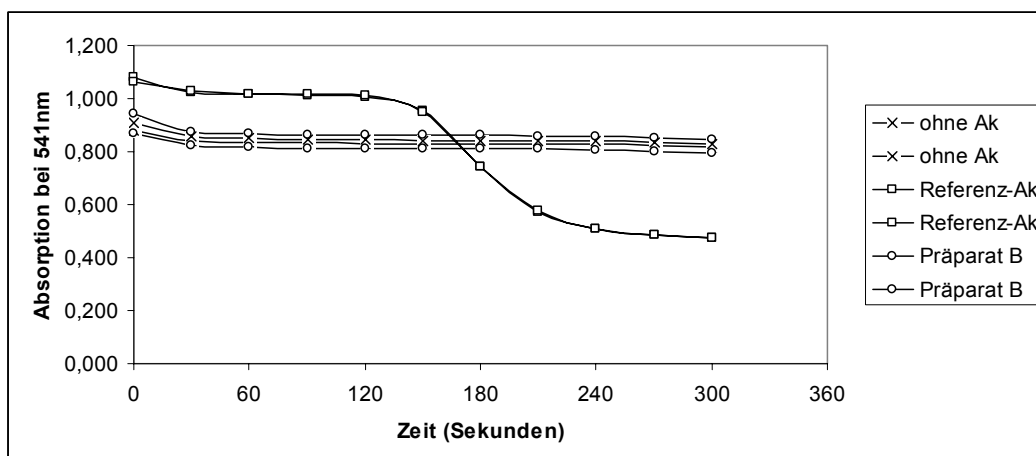


Abbildung 25 Hämolysekurve eines Pepsin-behandelten IVIG ohne Fc-Teil (Präparat B). Die fehlende Fc-Funktion zeigt sich durch eine parallel zum Kontrollansatz (ohne Ak) verlaufende Absorptionskurve.

4.6.1.2 Präparatepaare

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse des Fc-Funktionstests der IVIG, bei denen ein direkter Vergleich vor und nach Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte möglich war.

Die Fc-Funktion der zusätzlich S/D-virusinaktivierten Präparate A+ und H+ war gegenüber ihren Vorgängerpräparaten unverändert. Die ebenfalls S/D-behandelten Chargen des Präparates M+ zeigten im Vergleich mit dem Vorgängerpräparat M im Mittel eine leicht reduzierte Fc-Funktion. Alle untersuchten Chargen des Präparates M+ erreichten jedoch die geforderte Mindestaktivität (60%).

Eine im Vergleich zu dem Referenzantikörper (=100%) reduzierte Fc-Funktion wurde, mit Ausnahme der einzigen Charge von Präparat C, bei den modifizierten Präparatepaaren beobachtet.

Die durch Fettalkoholbehandlung virusinaktivierten Chargen des sulfonierten Präparates E+ zeigten im Durchschnitt eine etwas höhere Fc-Funktion als ihre Vorgängerchargen. Insgesamt besaßen die sulfonierten IVIG-Präparate von allen untersuchten Präparaten jedoch die niedrigste komplementaktivierende Aktivität.

4.6.1.3 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Das aus F(ab)₂-Anteilen bestehenden Präparat B führte zur keiner Hämolyse der Erythrozyten. Der in Tabelle 41 angegebene mittlere Fc-Index von 1% ist ein Artefakt der zugrunde gelegten Berechnungsmethode.

Obwohl das Präparat D unter einer milden Pepsin/pH4-Behandlung hergestellt wird, wurde ein mittlerer Fc-Index von 107% bestimmt. Die Fc-Funktion entspricht der von nicht modifizierten IVIG.

Die IgM-angereicherten und β -Propiolacton-behandelten Chargen des Präparates F hingegen weisen eine reduzierte Fc-Funktion (76%) auf, wie dies auch bei dem ebenfalls β -Propiolacton-behandelten Präparat C+ des gleichen Herstellers beobachtet werden konnte.

4.6.1.4 Nicht modifizierte IVIG

Die Ergebnisse der nicht modifizierten IVIG sind in Tabelle 42 zusammengefasst. Bei dem durch Hitzebehandlung virusinaktivierten Präparat G wurde ein mittlerer Fc-Index von 100% gemessen. Die Anwendung von Hitze führte auch bei Präparat J zu keiner Änderung in der Fc-Funktion. Die beiden S/D-behandelten Präparate I und L zeigten mit mittleren Fc-Indices von 96% bzw. 100% ebenfalls keine reduzierte Fc-Funktion. Der Verzicht auf die β -Propiolacton-Behandlung bei Präparat K (Nachfolgeprodukt von C bzw. C+) zeigte sich in einer verbesserten Fc-Funktion: Bei den zwei zur Verfügung stehenden Chargen wurde im Mittel ein Fc-Index von 107% im Vergleich zu 97% (Präparat C) und 81% (Präparat C+) bestimmt.

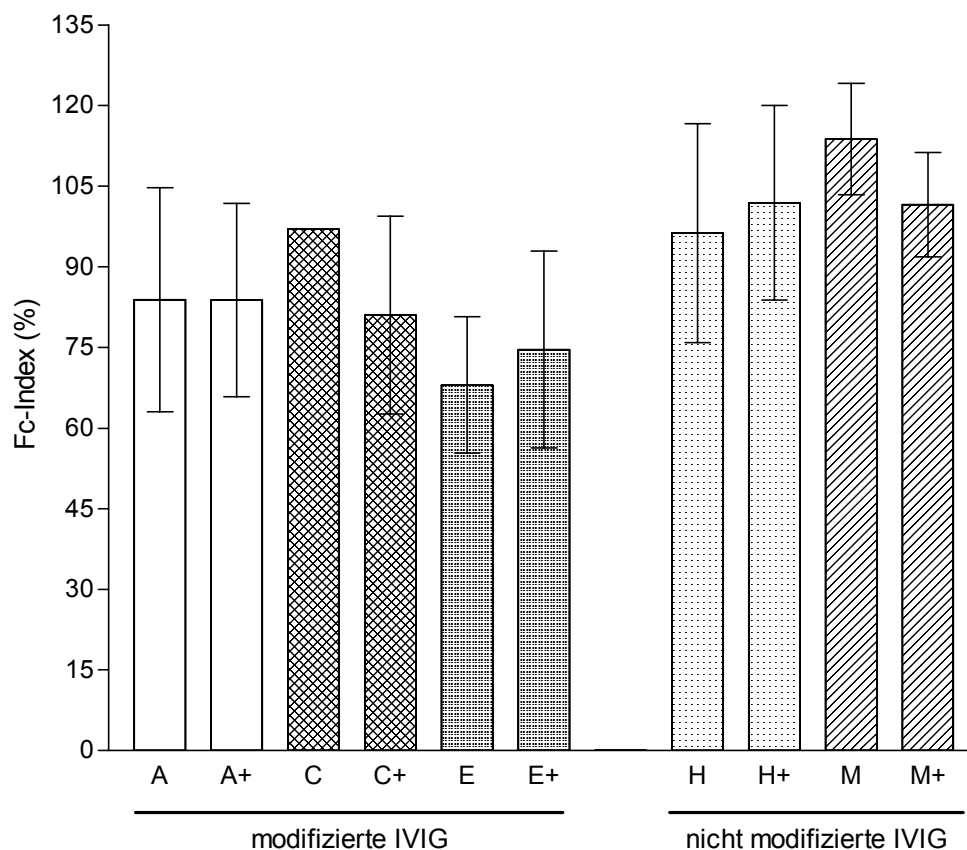


Abbildung 26 Fc-Funktion verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.

Tabelle 41 Fc-Funktionstest modifizierter IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Fc-Index	
		Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
A	10	84	21
A+	10	84	18
B	10	1	4
C	1	97	-
C+	10	81	18
D	10	107	22
E	10	68	13
E+	7	75	18
F	8	76	20

grau = Präparatepaare

Tabelle 42 Fc-Funktionstest nicht modifizierter IVIG

Präparat	Probenanzahl (n)	Fc-Index	
		Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
G	12	100	17
H	7	96	20
H+	10	102	18
I	9	96	15
J	10	102	6
K	2	107	4
L	10	100	9
M	9	114	10
M+	12	102	10

4.6.2 Fc-Rezeptor-Bindungstest

4.6.2.1 Fc γ -Rezeptorexpression

Für die Bindungsversuche wurde eine Zelllinie gesucht, die Fc γ -Rezeptoren exprimieren. Zur Auswahl standen drei Zelllinien monozytären Ursprungs (Mono Mac 6, U-937 und THP-1), die nach Literaturangaben Fc-Rezeptoren für IgG (Fc γ -R) besitzen sollen (ZIEGLER-HEITBROCK 1988, SUNDSTRÖM 1976, TSUCHIYA 1980).

Zum Nachweis der Fc γ -Rezeptorexpression wurden die Zellen mit FITC-markierten Antikörpern gegen die Fc γ -Rezeptortypen I bis III (CD16, 32, 64) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil Fc γ -Rezeptor positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messungen ergaben, dass alle drei Zelllinien überwiegend Fc γ -RII (CD32) exprimierten. Die Expressionsrate von Fc γ -RI (CD64) war dagegen deutlich niedriger. Fc γ -RIII (CD16) wurde nur von einem sehr geringen Anteil der Zellen exprimiert (Abbildung 27 und Abbildung 28).

Für die Fc-Bindungsversuche wurde schließlich die THP-1 Zelllinie ausgewählt, da diese über eine allgemein höhere Fc γ -Rezeptorexpression verfügte und den höchsten Anteil an Fc γ -RI aufwies. Dies ist für den Fc-Bindungstest von Vorteil, da Fc γ -RI bevorzugt monomeres IgG bindet, das in den IVIG-Präparaten in überwiegender Menge vorkommt.

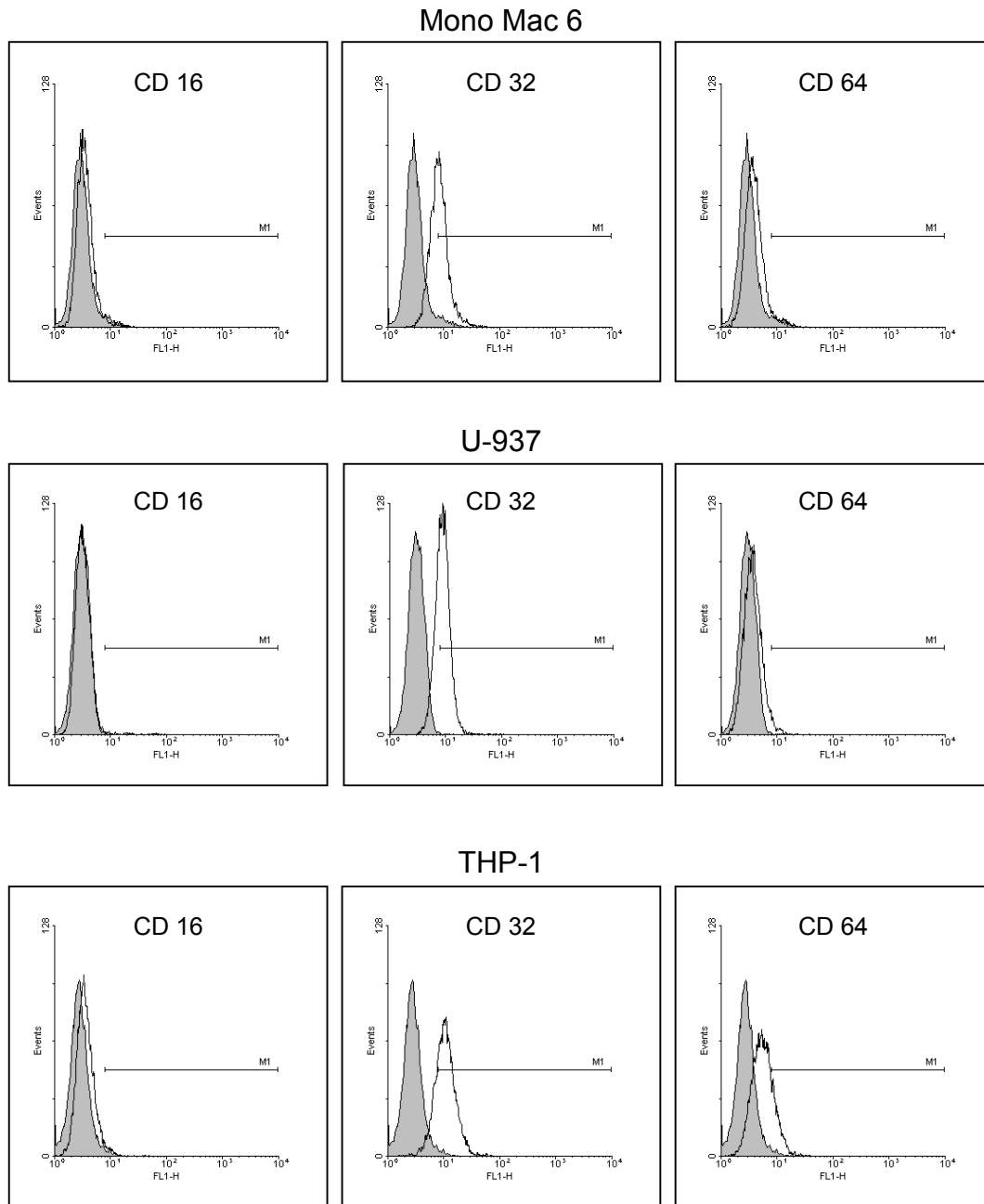


Abbildung 27 Expression von CD16, CD32 und CD64 auf den drei untersuchten Zelllinien (Mono Mac 6, U-937, THP-1). Dargestellt ist die Fluoreszenzverteilung der untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD16, CD32 und CD64. Die Negativ-Kontrollen sind grau unterlegt.

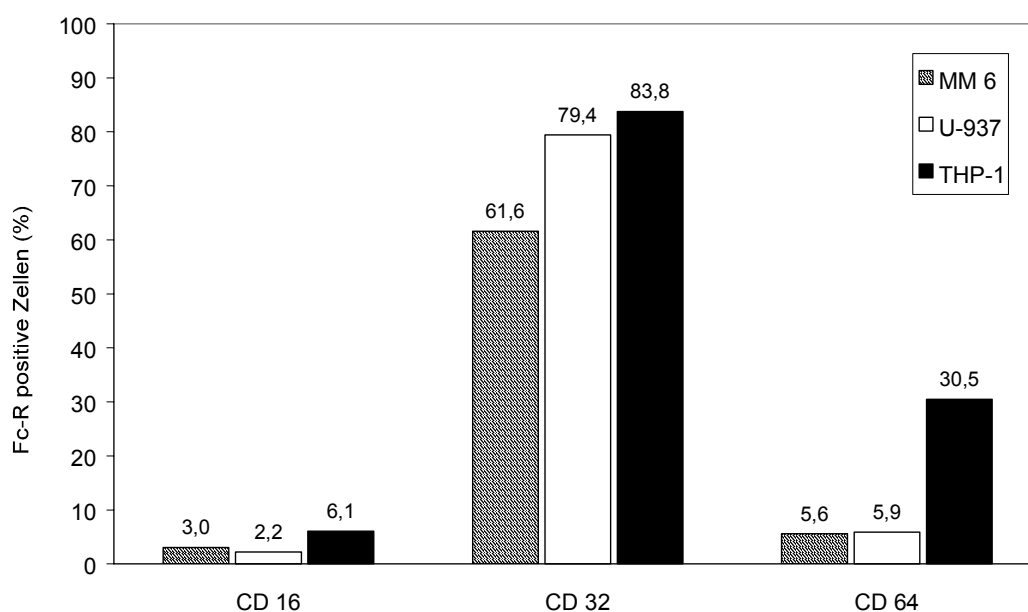


Abbildung 28 Anteil der CD16, CD32 und CD64 positiven Zellen der Zelllinien MonoMac 6 (MM 6), U-937 und THP-1.

4.6.2.2 Stabilität der Fcγ-Rezeptor-Expression

Vor weiteren Untersuchungen wurde die Expression der Fcγ-Rezeptoren während einer 4-wöchigen Kultivierung der THP-1 Zellen mehrmals bestimmt. Die Tabelle 43 zeigt, dass der Anteil Fcγ-Rezeptor positiver Zellen von Tag zu Tag variierte. Daher wurden die Bindungsversuche mit allen zu testenden IVIG jeweils am gleichen Versuchstag durchgeführt.

Tabelle 43 Stabilität der Fcγ-R Expression von THP-1

THP-1 Zellkultur			
Anteil Fcγ-Rezeptor positiver Zellen in %			
Tag der Messung	CD 16	CD 32	CD 64
1	9,5	98,2	82,1
18	9,5	73,9	17,8
24	5,4	83,8	30,5
25	15,6	96,5	71,1
28	6,6	85,4	9,9
30	7,4	99,8	82,8

4.6.2.3 Spezifität der Fc γ -Rezeptor-Bindung

Die Bindung von IgG an die Zellen erfolgte hauptsächlich über den Fc-Teil der Antikörper. Ein vernachlässigbarer Anteil der Antikörper wurde auch über die F(ab)₂-Region an die Zellen gebunden. Dies zeigte sich in einem Kompetitionsversuch zwischen intakten Antikörpern und F(ab)₂-Fragmenten:

Zu vorgegebenen Konzentrationen einer Referenzantikörper-Präparation (BRP) wurden zunehmende Mengen F(ab)₂-Fragmente beigemischt und das Gemisch anschließend mit den THP-1 Zellen inkubiert. Der Nachweis von gebundenem IgG (BRP) erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter F(ab)₂-Antikörper gegen human IgG (Fc-spezifisch).

Abbildung 29 zeigt die IgG-Bindung in Anwesenheit von F(ab)₂-Fragmenten. Das über den Fc-Teil gebundene BRP ließ sich auch durch Erhöhung der F(ab)₂-Konzentration nicht verdrängen. Die anfängliche Abnahme der Fluoreszenzintensität wird auf eine F(ab)₂-vermittelte IgG-Bindung an die Zelloberfläche zurückgeführt.

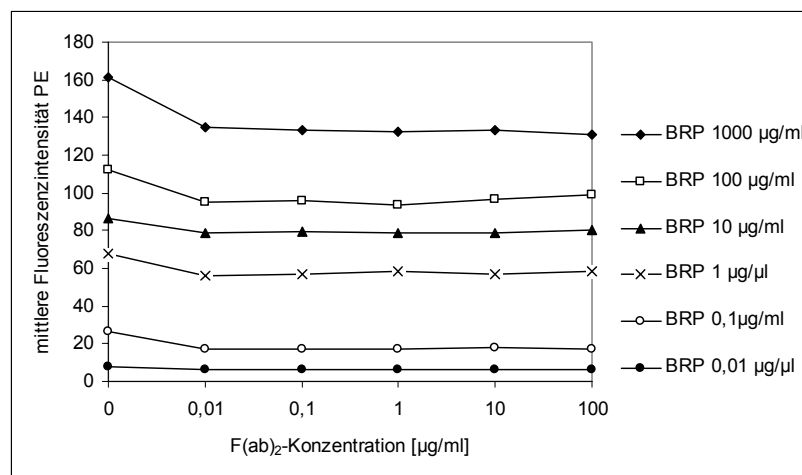


Abbildung 29 Kompetitionsversuch zwischen F(ab)₂-Fragmenten und IgG (BRP) zum Nachweis der spezifischen Bindung des Fc-Anteils von IgG mit den Fc-Rezeptoren der THP-1 Zellen. Das an die Zelloberfläche gebundene IgG wurde durch PE-makrierte Anti-human IgG Antikörper (Fc-spezifisch) detektiert.

4.6.2.4 Sensitivität der Methode

Um zu demonstrieren, dass das Testsystem in der Lage war, eine reduzierte Fc-Funktion nachzuweisen, wurde die Bindungskurve des Referenzantikörpers (BRP) mit der Bindungskurve von zwei Präparaten verglichen, die eine reduzierte (Präparat E) oder fehlende Fc-Funktion (Präparat B) im Fc-Funktionstest zeigten (siehe Tabelle 41). Wie in Abbildung 30 dargestellt, verliefen die erhaltenen Bindungskurven deutlich unterschiedlich. Das durch S-Sulfonierung modifizierte IVIG (Präparat E) zeigte gegenüber dem Referenzantikörper eine reduzierte Fc-Bindung, die durch eine flachere Bindungskurve charakterisiert war. Bei Präparat B (F(ab)₂-Fragment) verlief die Bindungskurve über einen Konzentrationsbereich von 0,001 µg/ml bis 10 µg/ml parallel zur mitgeführten Negativ-Kontrolle (Human Serum Albumin). Höhere Konzentrationen führten dagegen auch bei Präparat B zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

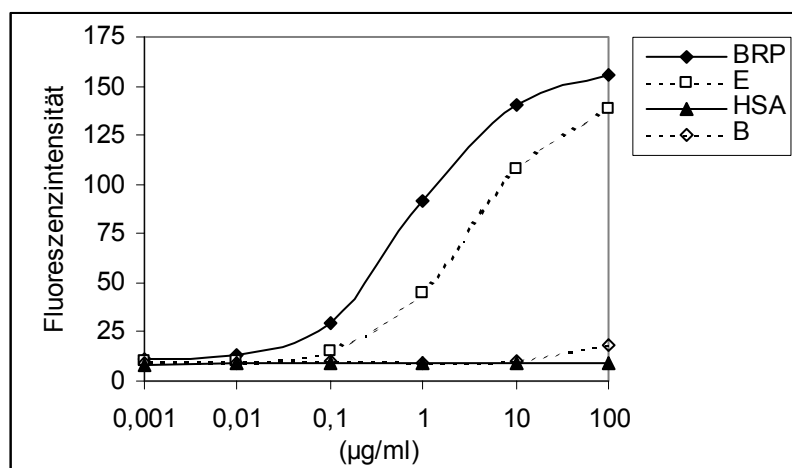


Abbildung 30 Vergleich der Fc-Bindungskurve des Referenzantikörpers (BRP) mit den Bindungskurven von Präparaten mit reduzierter (E) bzw. fehlender Fc-Funktion (B). Als Negativ-Kontrolle diente humanes Serum Albumin (HSA).

4.6.2.5 Bindungskurve von Präparat B nach Protein G-Adsorption

Um abzuklären, inwieweit die ab ca. 10 µg/ml zu beobachtende Fluoreszenzzunahme eventuell auf der Präsenz von Fc-Fragmenten beruht, wurde das Präparat B über eine Protein G beschichtete Affinitätsäule gereinigt. Protein G besitzt die Eigenschaft, IgG über die Fc-Region hochaffin zu binden. Der Durchlauf wurde zusammen mit dem unbehandelten Präparat B erneut im Fc-Bindungstest geprüft. Die Bindungskurve des aufgereinigten Präparates verlief deutlich flacher im Vergleich zu dem unbehandelten Präparat (Abbildung 31). Dies zeigt, dass das Präparat B neben F(ab)₂-Fragmenten auch Fc-Fragmente enthält. Die auch nach Adsorption noch messbare leichte Fluoreszenzzunahme beruht dagegen auf der Zunahme unspezifischer Bindungen bei hohen Proteinkonzentrationen, wie sie auch bei HSA beobachtet wurde. Für die weiteren Fc-Bindungsversuche wurden daher nur IVIG-Konzentrationen bis 100 µg/ml getestet.

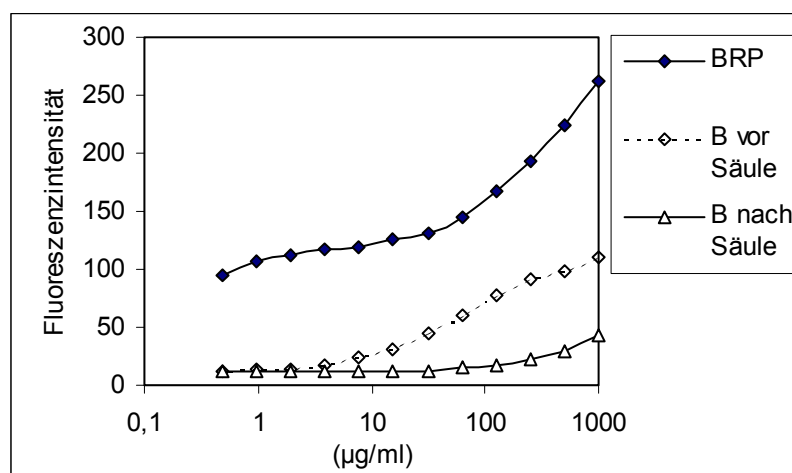


Abbildung 31 Fc-Bindungskurven von Präparat B vor und nach Protein G-Adsorption im Vergleich zu einem Referenzpräparat mit intaktem Fc-Teil. Die Proben wurden zunächst mit THP-1 Zellen inkubiert und anschließend an die Zelloberfläche gebundenes IgG mit PE-makierten Anti-human IgG Antikörpern (Fc-spezifisch) detektiert.

4.6.2.6 Fc-Bindung der untersuchten IVIG-Präparate

Die Fc-Bindung der verschiedenen IVIG-Präparate wurde im Anschluss an die Vorversuche vergleichend untersucht. Als Bezug diente die Fläche unter der Bindungskurve des mitgeführten Referenzantikörpers (BRP), die gleich 100% gesetzt wurde. Der von den IVIG erreichte Flächenanteil ist in Prozent angegeben. Dieses Auswerteverfahren bot den Vorteil, dass alle Messwerte, die bei verschiedenen IVIG-Konzentrationen erhalten wurden, in die Auswertung eingingen.

Die Inkubation der THP-1-Zellen mit den IVIG erfolgte auf Mikrotiterplatten (siehe 3.5.2.5). Präparatepaare vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte wurden parallel auf der gleichen Platte getestet. Der Referenzantikörper wurde auf jeder Platte mitgeführt.

4.6.2.7 Präparatepaare

In Abbildung 32 ist die Fc-Bindung bei Präparatepaaren dargestellt, bei denen ein direkter Vergleich vor und nach Einführung zusätzlicher virusinaktivierender Herstellungsschritte möglich war. Die Ergebnisse sind mit den der anderen untersuchten IVIG in Tabelle 44 und Tabelle 45 zusammengestellt.

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Fc-Bindung bestand zwischen den Chargen des Präparates A und A+. Das S/D-behandelte Präparat A+ wies eine etwas höhere Fc-Bindung gegenüber dem Vorgängerpräparat auf. Dagegen konnten keine Unterschiede zwischen den anderen Präparatepaaren gemessen werden.

Die einzige Charge des Präparates C wurde jeweils als Vergleichsprobe zu den drei Chargen des Nachfolgepräparates C+ im Test mitgeführt. Aus den drei Messwerten errechnete sich ein Variationskoeffizient von 7,8% als Maß für die Wiederholpräzision von Test zu Test. Die Behandlung mit β -Propiolacton zeigte sich nur bei dem zusätzlich nanofiltrierten Nachfolgepräparat C+ durch eine etwas niedrigere Fc-Bindung (Tabelle 41).

Die sulfonierten Präparate E und E+ wiesen im Vergleich zur Referenz-Antikörper-Präparation eine deutlich reduzierten Fc-Bindung (68,3% und 68,4%) auf.

Die bei Präparat E+ zusätzlich eingeführte Fettalkoholbehandlung besaß keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Ak mit Fc-Rezeptoren.

Bei den S/D-behandelten Präparatepaaren ließ sich, wie bereits oben erwähnt, kein Unterschied zwischen den S/D-behandelten und den Vorgängerpräparaten feststellen. Die Bindung an die Zellen war jedoch bei den Präparaten H und H+ höher, als bei Präparat M bzw. M+, was vermutlich die Folge des zugesetzten Albumins bei Präparat H/H+ ist.

4.6.2.8 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, besitzt Präparat B noch Fragmente, die an die Fc-Rezeptoren der Zellen binden können. Die Bindung der drei untersuchten Chargen an die Zellen war jedoch unterschiedlich stark. Im Vergleich zu dem Referenzmaterial wurden Werte zwischen 2,5 % bis 34,8 % gemessen.

Das unter milder Pepsin/pH4-Behandlung hergestellte Präparat D erreichte im Mittel eine Bindung von 99,1 %.

Bei dem β -Propiolacton-behandelten und IgM-angereicherten Präparat F wurde im Mittel eine Bindung von 104,4 % gemessen.

4.6.2.9 Nicht modifizierte IVIG

Die nicht modifizierten Immunglobuline besaßen, im Vergleich zum Referenzantikörper, eine Fc-Bindung von 92,3 % (Präparat M) bis 112,3 % (Präparat I). Der höchste Wert wurde von dem S/D-behandelten Präparat I erreicht. Das Präparat besitzt mit ca. 50 % den höchsten Albuminanteil der untersuchten Präparate, was die etwas erhöhten Werte (Zunahme unspezifischer Bindungen) erklärt. Die Herstellung des ebenfalls S/D-behandelten Präparates L enthält zusätzlich einen pH 4-Schritt, der auch virusinaktivierend wirkt. Die Fc-Bindung (102,5 %) wurde durch dieses Verfahren nicht beeinflusst.

Die Hitzebehandlung der Präparate G und J hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Fc-Bindung. Die fehlende β -Propiolacton-Behandlung führte bei Präparat K, dem Nachfolgepräparat von C bzw. C+, zu keiner messbaren Veränderung der Fc-Bindung.

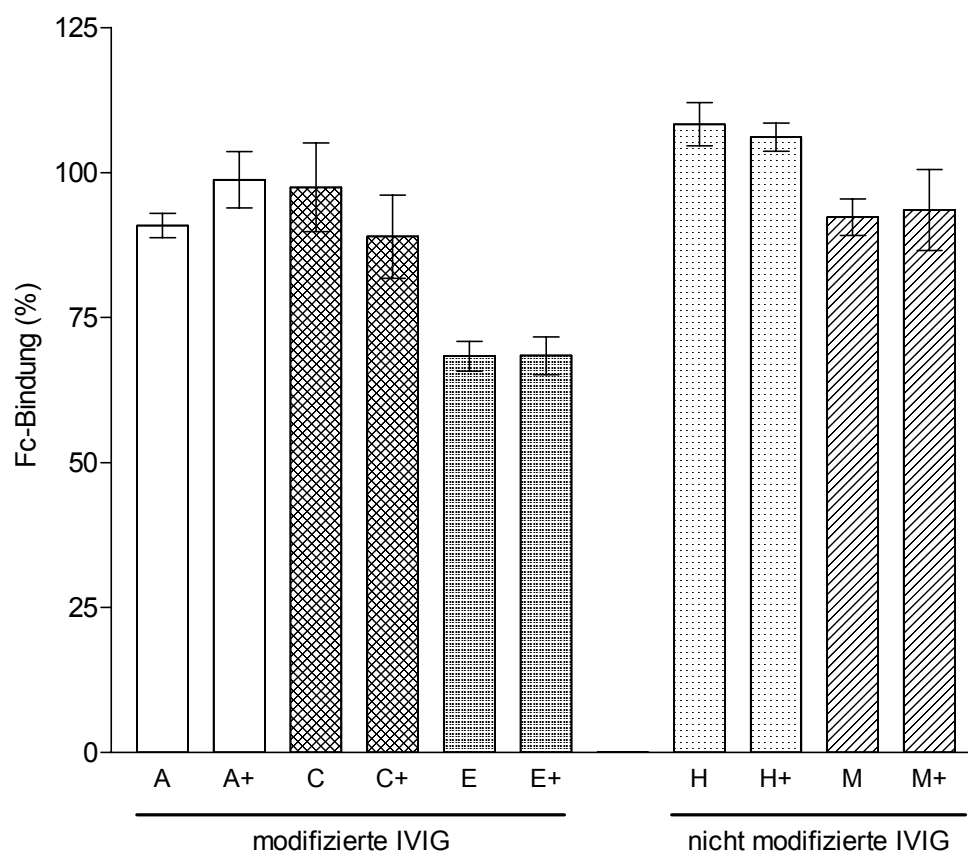


Abbildung 32 Fc-Bindung verschiedener IVIG vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte.

Tabelle 44 Fcγ-Rezeptorbindung chemisch oder enzymatisch modifizierter IVIG im Vergleich zu einem Referenzpräparat (100%).

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
A	3	90,9	2,1
A+	3	98,8	4,8
B	3	17,1	16,4
C	(3)		7,7
C+	3		7,2
D	3	99,1	5,5
E	3	68,3	2,6
E+	3	68,4	3,2
F	3	104,4	10,8

() = Wiederholungsprüfungen an einer Charge

Tabelle 45 Fcγ-Rezeptorbindung nicht modifizierter IVIG im Vergleich zu einem Referenzpräparat (100%).

Präparat	Probenanzahl (n)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)
G	3	96,1	6,2
H	3	108,4	3,7
H+	3	106,1	2,4
I	3	112,3	23,6
J	3	104,7	10,4
K	3	93,2	6,5
L	3	102,5	10,7
M	3	92,3	3,1
M+	3	93,6	7,0

4.6.3 Phagozytostest

Zu den wichtigsten IgG-Antikörperfunktionen gehört die Opsonisierung von Bakterien. Die Opsonisierung bewirkt (unter anderem) eine beschleunigte Aufnahme von Bakterien durch Phagozyten und führt zu einer effizienteren Eliminierung der Erreger (WRIGHT und DOUGLAS, 1904). Die gesteigerte Aktivität der phagozytierenden Zellen wird nach Bindung der Antikörper an die Bakterienoberfläche durch Interaktion des Fc-Teils der Antikörper mit den Fc γ -Rezeptoren der Granulozytenmembran vermittelt (ALLEN und ADEREM, 1996).

4.6.3.1 Methoden-Modifizierung

Der Test wurde mit einem kommerziellen Phagozytose-Testkit (Phagotest) durchgeführt, der normalerweise zur Bestimmung der zellulären Abwehrleistung von Phagozyten dient. Eine modifizierte Testdurchführung ermöglichte es, die Phagozytosefördernde Eigenschaft der IVIG zu bestimmen. Die Modifizierung bestand im wesentlichen aus der Entfernung der spendereigenen Antikörper und Komplementfaktoren durch ausgiebiges Waschen des Spenderblutes in PBS sowie in der Verwendung nicht voropsonisierter Bakterien (*S. aureus*).

Um die phagozytosefördernde Eigenschaft der verschiedenen IVIG-Präparate vergleichend zu untersuchen, wurden fluoreszenzmarkierte Bakterien (*S. aureus*) zusammen mit verschiedenen Verdünnungen der IVIG und Blut bei 37°C inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Phagozytose durch Abkühlen der Ansätze im Eiswasserbad verhindert. Anschließend wurde der Anteil an Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt, die Bakterien phagozytiert hatten.

4.6.3.2 Kontrollversuche

Versuche mit PBS, immunglobulinfreiem Serum, komplementhaltiges und komplementfreies (inaktiviertes) Plasma zeigten, dass die Phagozytoseaktivität der Granulozyten durch Antikörper und Komplementfaktoren gesteigert werden konnte (Abbildung 33). In Ansätzen mit PBS phagozytierten im Mittel $5,8 \pm 3,6$ % der Granulozyten. In den Ansätzen mit Serum ohne IgA, IgM und IgG $4,8 \pm 2,0$ %.

Um zu zeigen, dass die Phagozytoseaktivität auch nach den Waschschritten erhalten blieb, wurde den Zellen statt PBS wieder spendereigenes Plasma zugesetzt. Daraufhin stieg der Anteil phagozytischer Granulozyten auf $57,8 \pm 14,0$ %. Wurde das gleiche Plasma hitzeinaktiviert, phagozytierten nur noch $20,1 \pm 9,2$ % der Zellen, was die Bedeutung von Komplementkomponenten für die Phagozytose zeigt.

4.6.3.3 Spenderabhängige Variabilität der Phagozytoseaktivität

Für die Versuche wurde das Blut sieben verschiedener Spender verwendet. Wurde den gewaschenen Spenderzellen ihr eigenes Plasma zugesetzt, lagen die erreichten Phagozytoseraten - je nach Spender - zwischen 40,4 % bis 82,4%. Um auszuschließen, dass es durch die unterschiedliche Phagozytoseaktivität der Spenderzellen zu schwer interpretierbaren Ergebnissen kommt, wurden die IVIG-Präparate stets parallel mit dem Blut des gleichen Spenders getestet.

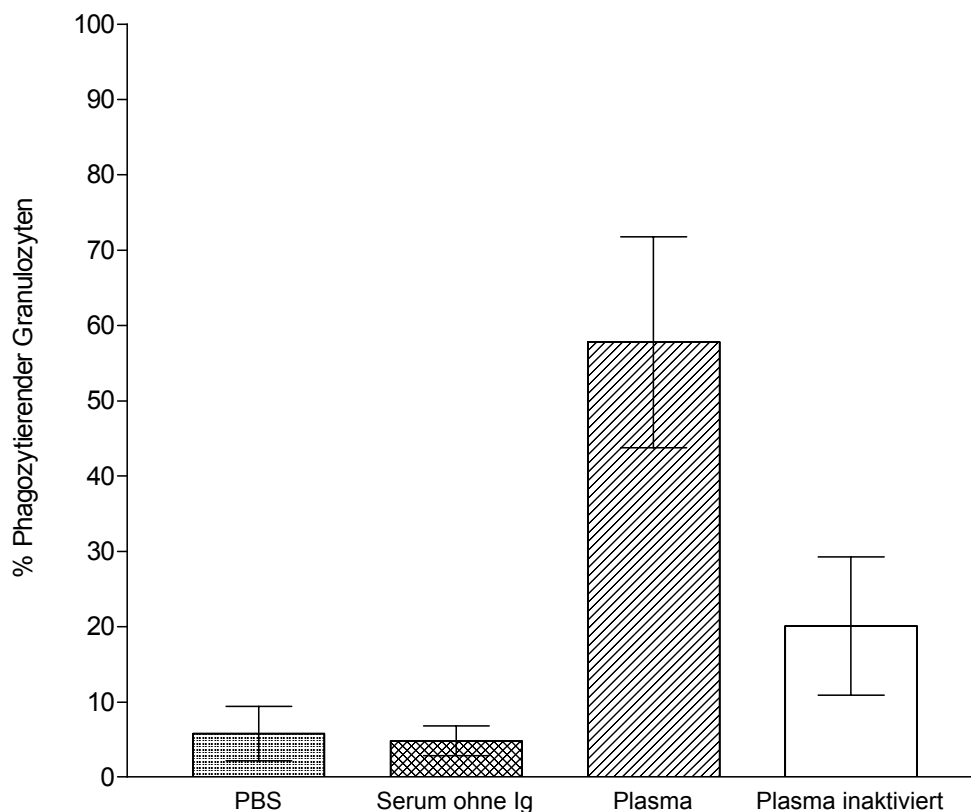


Abbildung 33 Anteil phagozytischer Granulozyten bei Zusatz verschiedener Kontrollen.

4.6.3.4 Dosisabhängige Phagozytoseförderung durch IVIG

Wurde statt PBS oder Plasma jeweils 100 µl der vorverdünnten IVIG-Lösung zu dem Ansatz hinzugefügt, konnte eine dosisabhängige phagozytosefördernde Wirkung von IVIG beobachtet werden. In Abbildung 34 ist exemplarisch dargestellt, wie das Testsystem auf unterschiedliche Dosen eines nicht modifizierten IVIG reagierte.

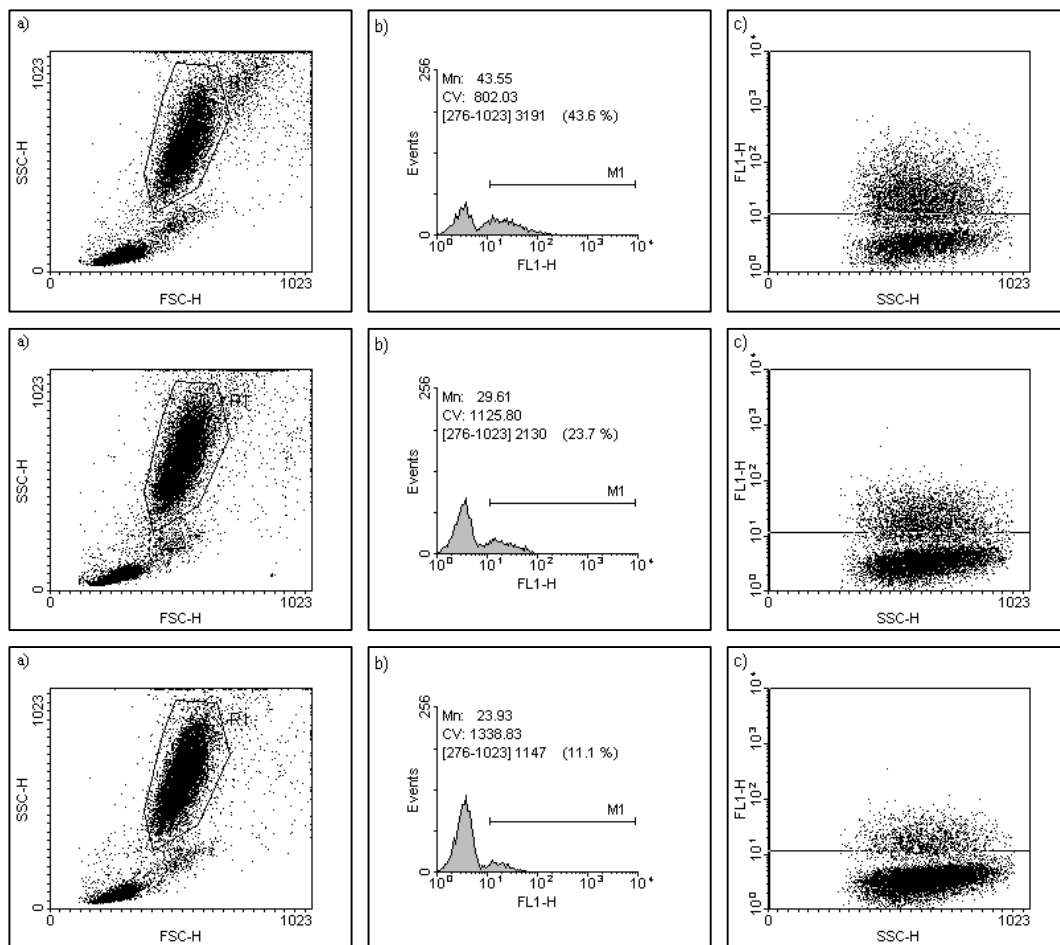


Abbildung 34 Phagozytose fluoreszenzmarkierter *S. aureus* in Abhängigkeit der verwendeten IVIG-Dosis (Präparat H). IVIG-Verdünnung oben: 1:10, mitte: 1:100, unten: 1:1000. a) Lage der Granulozyten (R1) im Streulichtdiagramm b) Histogramm der Fluoreszenzverteilung in R1 c) Dotplot: Anteil phagozytischer Granulozyten oberhalb des dargestellten Schwellenwertes, der zuvor anhand einer Negativkontrolle festgelegt wurde.

4.6.3.5 Präparatepaare

Bei wiederholter Testung (n=8) der gleichen Charge des Präparates C mit Blut verschiedener Spender variierte der Anteil phagozytierender Granulozyten zwischen 5,0 % und 18,2 %. Die Präparatepaare wurden deshalb immer paarweise mit gleichem Spenderblut untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaarten t-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Der prozentuale Anteil phagozytierender Granulozyten wurde dabei separat für jede IVIG-Konzentration miteinander verglichen. In Abbildung 35 ist die phagozytosefördernde Wirkung der Präparatepaare vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte dargestellt.

Im Vergleich zu dem Vorgängerpräparat A phagozytierten beim S/D-virusinaktivierten Präparat A+ mehr Granulozyten. Die Unterschiede waren in allen drei getesteten Verdünnungsstufen signifikant. Im Vergleich zu nicht modifizierten IVIG-Präparaten besaß das Trypsin-behandelte Präparatepaar A/A+ jedoch eine deutlich schwächere phagozytosefördernde Wirkung.

Die β -Propiolacton-behandelten Präparate C und C+ besaßen die schwächste phagozytosefördernde Wirkung aller untersuchten IVIG. Da nur eine Charge des Präparates C zur Verfügung stand, wurde diese stets im Vergleich zu dem nanofiltrierten Nachfolgepräparat C+ mitgeführt. Bei der IVIG-Verdünnung 1:10 phagozytierten unter Präparat C im Mittel 12,6 % der Granulozyten (n=8). Die Chargen des nanofiltrierten Nachfolgepräparates C+ (9,4 %) zeigten bei gleicher Verdünnung eine signifikant ($p=0,003$) reduzierte phagozytosefördernde Wirkung. Bei den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 war der Unterschied jedoch nicht mehr signifikant.

Das sulfonierte Präparatepaar (E/E+) besaß gegenüber den nicht modifizierten IVIG ebenfalls eine deutlich reduzierte phagozytosefördernde Wirkung. Zwischen Präparat E und dem zusätzlich Fettalkohol-behandelten Präparat E+ konnten keine Unterschiede gemessen werden.

Die nicht modifizierten Präparatepaare H/H+ und M/M+ zeigten im Vergleich zu modifizierten IVIG ein deutlich besseres Vermögen die Phagozytose von *S. aureus* durch Granulozyten zu fördern. Zwischen S/D-behandelten und nicht behandelten Präparaten bestand statistisch kein signifikanter Unterschied.

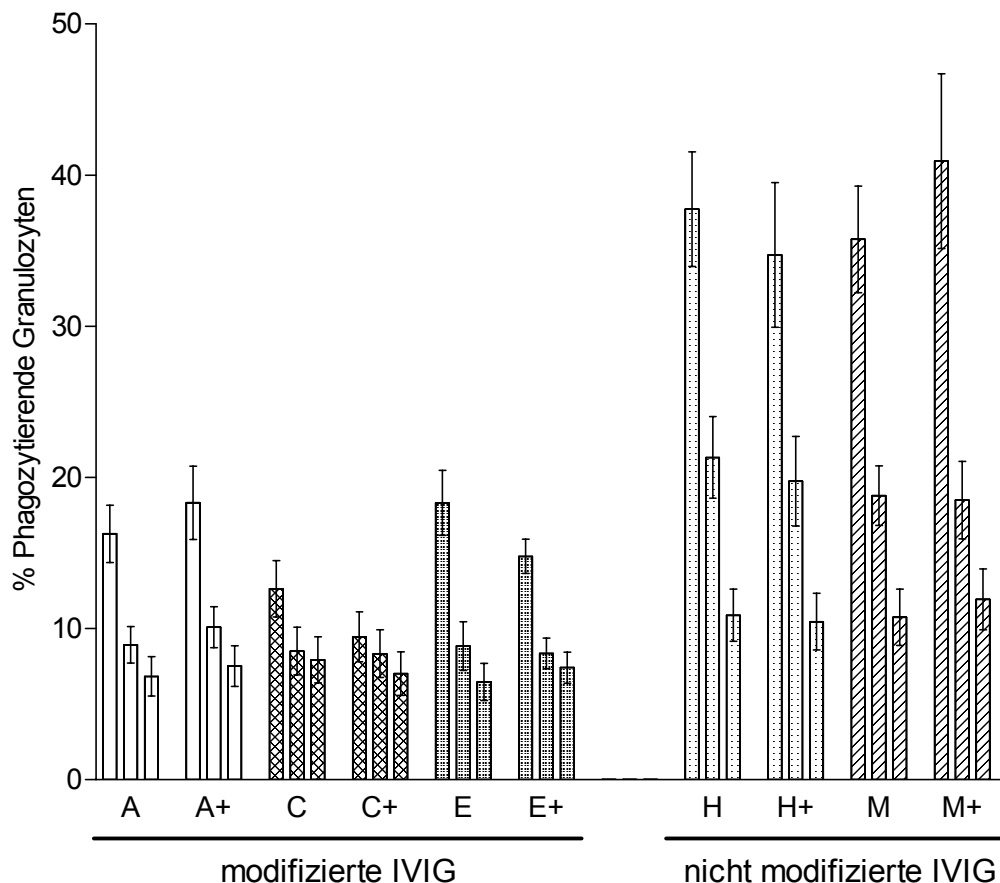


Abbildung 35 Phagozytosefördernde Eigenschaft verschiedener IVIG-Präparate vor und nach (+) Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte. Jedes IVIG-Präparat wurden in drei Verdünnungen getestet. (Balken links = 1:10, mitte = 1:100, rechts = 1:1000). Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes der getesteten IVIG-Chargen (n = 8-9).

4.6.3.6 Chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG

Die Ergebnisse der chemisch oder enzymatisch behandelten IVIG sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

Das durch Pepsinverdau in F(ab)₂-Teile gespaltene Präparat B besitzt in der 1:10 Verdünnung noch eine geringe phagozytosefördernde Wirkung (17,9 %). Im Vergleich zu einem nicht modifizierten IVIG-Präparat (35,8 % bei Präparat M), ist die phagozytosefördernde Wirkung jedoch deutlich geringer.

Der IgG-Gehalt der einzig getesteten Charge des Präparates D wurde vor den weiteren Verdünnungen von 60 mg/ml auf 50 mg/ml eingestellt, damit für den Vergleich mit anderen Präparaten gleiche Ausgangsbedingungen vorlagen. Das Pepsin- und pH4-behandelte Präparat D war 1:10 verdünnt in der Lage 30,1 % der Granulozyten zu aktivieren. Parallel wurde auch eine Charge des β -Propiolacton-behandelten und IgM-haltigen Präparates F getestet. Mit 14,7 % zeigte das Präparat eine um fast 50 % niedrigere phagozytosefördernde Wirkung als Präparat D.

4.6.3.7 Nicht modifizierte IVIG

Innerhalb der relativ kurzen Zeitspanne, in der die Granulozyten Bakterien phagozytieren konnten (10 min), wurden durch nicht modifizierte IVIG etwa 50 % mehr Granulozyten zur Phagozytose angeregt (siehe Tabelle 47). Die nicht modifizierten IVIG besaßen damit im Vergleich zu modifizierten IVIG eine deutlich höhere phagozytosefördernde Wirkung. Die nicht modifizierten IVIG erreichten in der 1:10 Verdünnung Phagozytoseraten zwischen 26,6 % (Präparat I) und 40,9 % (Präparat M+). Von Präparat I wurde jedoch nur eine Charge getestet, so dass dessen Ergebnis nicht mit dem Mittelwert der anderen IVIG-Präparate verglichen werden kann. Festzuhalten bleibt, dass die Hitzebehandlung (Präparat G und J) oder die S/D-Behandlung (Präparate H+, L und M+) sich nicht negativ auf die phagozytosefördernde Eigenschaft der IVIG-Präparate auswirkt. Dagegen führt die chemische oder enzymatische Behandlung der IVIG zu Präparaten mit eingeschränkter biologischer Funktion.

Tabelle 46 Phagozytosefördernde Eigenschaft modifizierter IVIG

S.aureus phagozytierende Granulozyten in % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)				
Verdünnung	nicht zusätzlich virusinaktiviert		zusätzlich virusinaktiviert	
	Präparat	Probenanzahl (n)	Präparat	Probenanzahl (n)
	A		A+	
1:10	16,3 $\pm$ 5,7	9	18,3 $\pm$ 7,3	9
1:100	8,9 $\pm$ 3,6	9	10,1 $\pm$ 4,1	9
1:1000	6,8 $\pm$ 3,9	9	7,5 $\pm$ 4,1	9
	B			
1:10	17,9 $\pm$ 6,9	9		
1:100	7,2 $\pm$ 3,2	8		
1:1000	7,0 $\pm$ 3,9	8		
	C		C+	
1:10	12,6 $\pm$ 5,3	8	9,4 $\pm$ 5,0	9
1:100	8,5 $\pm$ 4,5	8	8,3 $\pm$ 4,7	9
1:1000	7,9 $\pm$ 4,3	8	7,0 $\pm$ 4,3	9
	D			
1:10	30,1	1		
1:100	14,7	1		
1:1000	4,6	1		
	E		E+	
1:10	19,3 $\pm$ 6,2	8	14,2 $\pm$ 3,1	8
1:100	9,4 $\pm$ 4,9	8	7,9 $\pm$ 3,0	9
1:1000	6,8 $\pm$ 3,7	8	7,0 $\pm$ 3,0	9
	F			
1:10	14,7	1		
1:100	8,3	1		
1:1000	4,6	1		

Tabelle 47 Phagozytosefördernde Eigenschaft nicht modifizierter IVIG

S.aureus phagozytierende Granulozyten in % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)				
Verdünnung	nicht zusätzlich virusinaktiviert		zusätzlich virusinaktiviert	
	Präparat	Probenanzahl (n)	Präparat	Probenanzahl (n)
	G			
1:10	37,6 $\pm$ 10,1	9		
1:100	16,3 $\pm$ 5,4	9		
1:1000	9,1 $\pm$ 4,7	9		
	H		H+	
1:10	37,8 $\pm$ 10,7	8	37,9 $\pm$ 11,4	8
1:100	21,3 $\pm$ 7,6	8	21,4 $\pm$ 7,8	8
1:1000	10,9 $\pm$ 4,9	8	11,1 $\pm$ 5,6	8
	I			
1:10	26,6	1		
1:100	14,6	1		
1:1000	5,6	1		
	J			
1:10	40,1 $\pm$ 8,0	8		
1:100	20,5 $\pm$ 5,7	8		
1:1000	10,7 $\pm$ 4,3	8		
	K			
1:10	n.d.			
1:100	n.d.			
1:1000	n.d.			
	L			
1:10	37,2 $\pm$ 6,3	8		
1:100	21,9 $\pm$ 6,5	9		
1:1000	9,7 $\pm$ 3,5	8		
	M		M+	
1:10	35,8 $\pm$ 10,0	8	40,9 $\pm$ 16,3	8
1:100	18,8 $\pm$ 5,5	8	18,5 $\pm$ 7,3	8
1:1000	10,7 $\pm$ 4,9	7	11,9 $\pm$ 5,7	8

n.d. = nicht durchgeführt

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Eigenschaften intravenöser Immunglobuline vor und nach Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsschritte zu charakterisieren. Die Untersuchungen wurden deshalb an Präparatepaaren durchgeführt, die aus Vorgänger- und zusätzlich virusinaktiviertem Nachfolgepräparat bestanden. Darüber hinaus wurden weitere Immunglobulin-Präparate untersucht, da seitens der Ärzte klinische Anforderungen an IVIG gestellt werden, die weder durch die vorliegende Arzneimittelmonographie noch durch Angaben aus der Zulassungsdokumentation berücksichtigt werden. Die Anforderungen umfassen ein definiertes Antikörperspektrum gegen klinisch relevante bakterielle und virale Erreger, bestimmte biologische Funktionen wie Opsonisierung sowie Untersuchungen der biologischen Eigenschaften in Abhängigkeit der gewählten Virusinaktivierung oder Molekülmodifikation.

Zur biologischen Charakterisierung enthält die Monographie Forderungen, die Produkte mit gleichbleibender biochemischer Qualität und Reinheit gewährleisten, es werden jedoch nur wenig klinisch relevante Daten gefordert. Beispielsweise hat der Hersteller lediglich nachzuweisen, dass eine 3-fache Anreicherung von Antikörpern gegen ein virales und ein bakterielles Antigen im Endprodukt stattfindet. Hierbei kann der Hersteller jedoch frei über die Auswahl der Antikörperspezifität und deren Bestimmungsmethode entscheiden. Damit ist ein Vergleich der verschiedenen IVIG anhand der Zulassungsdokumentation nur schwer bzw. a priori nicht möglich. Andere biologische Eigenschaften der Präparate, wie die Fc-Funktion sind lediglich während der Entwicklung zu definieren. Die Subklassenverteilung muss lediglich deklariert werden, eine Diskussion der individuellen Subklassenverteilung im Hinblick auf die normale Verteilung im Plasma ist nicht gefordert. Darüber hinaus müssen Kliniken zunehmend auf ökonomische Zwänge achten und fragen daher nach klinisch relevanten Funktionen und Charakteristika von IVIG, vor allem auch im Vergleich der einzelnen Herstellungsverfahren.

Im Rahmen der Virussicherheit intravenöser Immunglobuline zählen unbehüllte Viren, wie das humane Parvovirus B19, zu den transfusionsmedizinisch bedeutsamen Viren, da sie nicht durch die eingesetzten Lösungsmittel/Detergenzien inaktiviert werden können. Ausgehend von dieser Kenntnis wird zur Zeit diskutiert, dass Immunglobuline Antikörper gegen das Parvovirus B19 enthalten sollen. Bislang lagen jedoch nur vereinzelte und selten vergleichbare Angaben über den Gehalt von Anti-Parvovirus-B19-Antikörpern in Immunglobulinen vor. Daher wurde u.a. der Anti-Parvovirus-B19-Gehalt der verschiedenen Immunglobulin-Präparate bestimmt und vergleichend dargestellt. Darüber hinaus wurden die Immunglobulin-Präparate und die zur ihrer Herstellung verwendeten Plasmapools mittels PCR auf Parvovirus-B19 DNA untersucht.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der IVIG ergaben schwerpunktmäßig folgende Ergebnisse:

A) Einfluss der Virusinaktivierungs-/Eliminierungsverfahren:

- Die zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungs-/Eliminierungsschritte verändern die Eigenschaften der IVIG-Präparate nicht.

B) Einfluss der verschiedenen Herstellungsverfahren:

- Die chemische oder enzymatische Behandlung der Immunglobulin-Präparate bei der Herstellung führt zu nachweisbaren Modifizierungen der Antikörpermoleküle, die in der Regel mit verminderter Antigenbindung und Funktionseinschränkungen der Antikörper einhergehen.
- Die enzymatische Behandlung führt, in Abhängigkeit der eingesetzten Proteasen und angewandten Reaktionsbedingungen, zu einer mehr oder minder stark ausgeprägten Fragmentierung der Antikörpermoleküle. Es wird angenommen, dass der Gehalt an Fragmenten zusätzlich durch verschiedene Aufreinigungs- bzw. Filtrationsschritte beeinflusst wird.
- Die enzymatische Behandlung kann zu Veränderungen der Antikörperdeterminanten führen, die eine Erkennung durch Anti-human IgG Antikörper erschweren oder verhindern.

- Die chemische Behandlung mit β -Propiolacton führt zur Bindung chemischer Gruppen an das Antikörpermolekül. In der SDS-PAGE wandern die Proteine aufgrund des höheren Molekulargewichtes etwas langsamer, als die Proteine in nicht behandelten Präparaten. Im Vergleich zu nativen Präparaten, zeigten die β -Propiolacton-behandelten Präparate in der Regel reduzierte Antikörpergehalte und verminderte Antikörperfunktionen.
- Die S-Sulfonierung führt zur Spaltung der Disulfidbrücken, die für den Zusammenhalt der H- und L-Polypeptidketten der Antikörpermoleküle verantwortlich sind. Die Spaltung findet nicht gleichmäßig an allen Disulfidbrücken der Antikörpermoleküle statt, so dass in dem Präparat die verschiedenen möglichen Kombinationen aus H- und L-Ketten bis hin zu vollständigen Antikörpermolekülen vorliegen. In dieser Form können nur die vollständigen (intakten) Antikörper funktionell aktiv sein. Der gegenüber anderen Präparaten geringe Anteil intakt vorliegender Antikörper erklärt sowohl die niedrigen Messwerte bei der Bestimmung verschiedener Antikörpergehalte, als auch die reduzierten funktionellen Eigenschaften der S-sulfonylierten IVIG.

C) Methoden

- Die Herkunft der Plasmen oder ihre Selektion beeinflusst den Gehalt an spezifischen Antikörpern und die Höhe der Titer.
- Die SDS-PAGE ist als Identitätstest geeignet, da Antikörperfragmente, die während der enzymatischen Behandlung oder der S-Sulfonierung entstehen, in der SDS-PAGE präparatespezifische Bandenmuster erzeugen. Bei nicht modifizierten, albuminhaltigen IVIG ist eine Identifizierung anhand der Stärke der Albuminbanden möglich. Zusätzliche Banden bei nicht modifizierten IVIG, die zuvor mit DTT reduziert wurden, stellen mögliche Artefakte der Methode dar. Sie sind Folge einer unzureichenden Reduktion bzw. Reoxidation der Proben. Um dies auszuschließen, wurde die SDS-PAGE auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

- Die Modifizierung der IVIG erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Bei der Bestimmung der Antikörpergehalte, IgG-Subklassen oder anderer Parameter, zu deren Messung markierte Antikörper eingesetzt werden, kann ein niedriger Messwert durch einen tatsächlich niedrigen Gehalt oder aber durch eine unzureichende Bindung des markierten Antikörpers an das modifizierte IVIG bedingt sein. Modifizierte IVIG sind daher schlechter *in vitro* charakterisierbar als native.
- Der Hämolyse-Hemmungstest, der zur Bestimmung des Anti-Staphylolysin- und Anti-Streptolysin-Gehaltes benutzt wurde und der Hämagglutinations-Hemmungstest (Anti-Röteln-Bestimmung) sind beide nicht geeignet moderate Veränderungen an den Antikörpermolekülen nachzuweisen, da mit ihnen nur eine grobe Titerbestimmung möglich ist.
- Der Fc-Rezeptor-Bindungstest reagierte auf Veränderungen des Fc-Teils der Antikörpers nur, wenn dieser durch Spaltung der Disulfidbrücken oder Verlust des Fc-Teils stark modifiziert wurde. Zusätzlich wird die Fc-Rezeptor-Bindung durch den Albumingehalt der Präparate beeinflusst. Der Fc-Bindungstest kann daher nicht den in der Monographie geforderten Fc-Funktionstest ersetzen.
- Die ELISA-Tests zum Nachweis bzw. Bestimmung von Antikörpern gegen HAV, Parvovirus B19, CMV, VZV und HBsAg erwiesen sich als geeignet, Unterschiede zwischen den Präparaten zu erkennen. Die Bestimmung der F(ab)₂-Fragmente bei Präparat B war mit dem Parvovirus B19-, CMV- und VZV-ELISA nicht möglich, da sie einen Fc-Teil zur Bindung des Nachweisantikörpers voraussetzen.
- Die folgenden Methoden waren geeignet, Unterschiede zwischen Immunglobulin-Präparaten zu erkennen: SDS-PAGE, radiale Immundiffusion, Fc-Funktionstest gemäß Monographie und der Phagozytostest.
- Messergebnisse der verschiedenen Tests könnten durch Unterschiede in der IgG-Subklassen-Zusammensetzung der IVIG beeinflusst werden.

- Zur Feststellung der vollständigen biologischen Aktivität der Präparate ist die *in vitro* Untersuchung bzw. Prüfung der Antikörperfunktionen, wie Komplementaktivierung, Fc-Rezeptorbindung und Phagozytoseförderung notwendig. Der neu entwickelte Phagozytostest ergänzt den in der Monographie geforderten Fc-Funktionstest. Er reagierte empfindlicher als der Fc-Funktionstest auf modifizierte Immunglobuline.

D) Charakteristika der IVIG

- IVIG sind nicht beliebig austauschbar, da sie individuelle Eigenschaften besitzen (z.B. HAV-Gehalt, Unterschiede im IgG1- und IgG2-Gehalt, niedriger Gehalt oder Fehlen der IgG-Subklassen 3 und 4, unterschiedliche Fc-Funktionalität etc.).
- Die Charakteristika der IVIG werden im wesentlichen durch das Herstellungsverfahren festgelegt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Einteilung in modifizierte und nicht modifizierte IVIG gerechtfertigt ist.

5.1 Methodenauswahl

Viele Methoden, die zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper zur Verfügung stehen, können bei polyklonalen Antikörpern aufgrund ihrer molekularen Heterogenität nicht angewandt werden. So besteht die Möglichkeit, die Aminosäuresequenz monoklonaler Antikörper zu bestimmen, da sie als Produkt eines einzigen Zellklons immer die gleiche Aminosäuresequenz besitzen. Dagegen ist eine Bestimmung der Aminosäuresequenz polyklonaler Antikörper problematisch, da sie aufgrund ihrer polyklonalen Herkunft ein Gemisch aus verschiedenen Antikörper-Spezifitäten, -Klassen und -Subklassen darstellen. Eine Aufreinigung und Isolation bestimmter Antikörperspezifitäten wäre zwar prinzipiell möglich (durch Immunadsorptionstechniken mit einem definierten Antigen und anschließender Isolierung), doch bleibt die Aussagekraft einer solchen Untersuchung aus den folgenden Gründen fraglich:

1. Die in der Natur vorkommenden Antigene besitzen in der Regel mehrere Epitope, gegen die Antikörper gebildet werden können. Daher werden sich bereits verschiedene Antikörper finden lassen, die gegen das gleiche Antigen gerichtet sind. Daraus folgt, dass auch antigenadsorbierte Antikörper unterschiedliche Aminosäuresequenzen der F(ab)₂-Region aufweisen werden. Zusätzliche Sequenzunterschiede sind durch die verschiedenen Klassen- und Subklassenzugehörigkeiten der Antikörper zu erwarten.

2. Aus der alleinigen Kenntnis der Aminosäuresequenz lassen sich bislang nur sehr beschränkt Aussagen zur Funktion der Antikörper ableiten. Daher werden zur Funktionsprüfung monoklonaler Antikörper andere, spezifisch angepasste Untersuchungsmethoden angewandt.

Weitere Charakterisierungsverfahren monoklonaler Antikörper, wie die Analyse des Glykosylierungsmusters, das Peptidmapping (BONGERS, 2000), die Massenspektroskopie und die Isoelektrische Fokussierung, setzen ebenfalls einen einheitlichen Aufbau der Antikörpermoleküle voraus. Solche Methoden eignen sich daher nicht zur Untersuchung polyklonaler Antikörper.

5.1.1 Charakterisierung polyklonaler Antikörper

Die Arzneibuchmonographie „Immunglobulinum humanum normale ad usum intravenosum“ (DAB 10, 1994) enthält vorwiegend Prüfungen, die die Identität und Reinheit der Präparate feststellen. Die Prüfung auf Identität soll nachweisen, dass das Präparat aus humanen Proteinen besteht und keine tierischen Proteine enthält. Der Hauptbestandteil muss dem IgG-Anteil des Normalserums vom Menschen entsprechen. Albumin darf als Stabilisator dem Präparat zugesetzt werden. Die Prüfung auf Reinheit umfasst die Bestimmung des Löslichkeitsverhaltens bei gefriergetrockneten Präparaten, des pH-Wertes, der Osmolalität, des Gesamtproteingehaltes, der Proteinzusammensetzung und der Molekülgrößenverteilung.

Diese Prüfungen lassen jedoch nur bedingt eine Aussage über die biologische Wirksamkeit der Immunglobulinmoleküle zu. So dient die Prüfung der Molekülgrößenverteilung hauptsächlich dazu, die intravenöse Verträglichkeit der Präparate über die Bestimmung des Aggregatgehaltes (höchstens 3%) zu sichern.

Eine Aussage bezüglich der biologischen Wirksamkeit der Antikörpermoleküle ist eingeschränkt möglich, da mit der Methode (HPLC) eine Fragmentierung der Antikörper nachgewiesen werden kann. Nur Antikörper mit intakter Struktur können vollständige biologische Funktionen erfüllen, daher müssen die Präparate einen Mindestgehalt von 90% monomeren und dimeren IgG aufweisen. Dies gilt jedoch nicht für IVIG, die enzymatisch oder chemisch modifiziertes IgG enthalten. Diese Präparate dürfen eine abweichende Molekülgrößenverteilung aufweisen, da ihre Verträglichkeit durch die Modifizierung gesichert wird.

Neben der Molekülgrößenverteilung enthält die Monographie zusätzliche Parameter zur Verträglichkeitsprüfung der Präparate (Bestimmung der antikomplementären Aktivität, des Präkallikrein-Aktivators und der Anti-A/Anti-B-Hämagglutinine). Weitere Anforderungen betreffen den Wassergehalt bei gefriergetrockneten Präparaten, Sterilität, Pyrogengehalt und Hinweise zur Lagerung und Beschriftung.

Zur biologischen Charakterisierung der Antikörper enthält die Monographie einen Fc-Funktionstest, der die komplementaktivierende Eigenschaft der Antikörper prüft. Methodisch bedingt können jedoch nur Antikörper mit Anti-Röteln-Spezifität geprüft werden. Die Monographie verlangt des weiteren die Bestimmung des Anti-HBsAg-Gehaltes (mindestens 0,5 IE/g IgG) sowie den Nachweis, dass im Endprodukt eine mindestens 3-fache Anreicherung der Antikörper gegenüber dem Ausgangsmaterial stattfindet. Die Anreicherung ist für Ak gegen ein virales und ein bakterielles Antigen zu belegen. Der erzielte Anreicherungsfaktor bestätigt lediglich die Ankonzentrierung der Antikörper. Über die Charakteristika der Präparate, besonders im Vergleich zu anderen Präparaten, sagen diese Nachweise nur wenig aus, da es den Herstellern freigestellt ist, welche Nachweismethode sie zur Messung der Antikörpergehalte anwenden. Um die Antikörpertiter verschiedener polyklonaler Präparate miteinander vergleichen zu können, müssen sie mit der gleichen Untersuchungsmethode bestimmt werden. Die Messung der Antikörpertiter ist für eine Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern allein nicht ausreichend. Sie kann jedoch, unter definierten Bedingungen durchgeführt, Hinweise auf die Integrität des antigenbindenden Teils der Antikörper geben.

Andere Eigenschaften wie Fc-Funktion, Fc-Rezeptor-Bindung oder die phagozytosefördernde Wirkung der Immunglobuline müssen zusätzlich geprüft werden, um polyklonale Immunglobuline zu charakterisieren.

5.1.2 Einfluss der Plasmaherkunft auf den Antikörpergehalt

In den vergleichenden Untersuchungen wurde der spezifische Antikörpergehalt als Maß für die Integrität des F(ab)-Bereichs der Antikörper herangezogen. Der Vergleich zweier Proben basierte dabei auf der Annahme, dass die Antikörper in beiden Proben in etwa gleicher Konzentration vorliegen. Davon konnte ausgegangen werden, da zur Herstellung von IVIG meist mehrere tausend Plasmen vereint werden. Weiter wurde angenommen, dass Strukturveränderungen des antigenbindenden Bereiches zu einem veränderten Bindungsverhalten des Antikörpers führen und das dies in einem empfindlichen Nachweissystemen, wie dem ELISA-Test, nachweisbar ist.

Einige Ergebnisse aus den Antikörperbestimmungen lassen jedoch den Schluss zu, dass die oben gemachten Annahmen nicht immer zutrafen. Die vergleichende Bestimmung des Anti-HAV-Gehaltes bei Präparat A bzw. A+ ergab, dass das Präparat A+ gegenüber dem Vorgängerpräparat A einen statistisch signifikant reduzierten Anti-HAV-Gehalt aufwies. Dagegen wurden keine Unterschiede im Anti-Parvovirus B19-, Anti-HBsAg-, und Anti-VZV-Gehalt gefunden. Der Anti-CMV-Gehalt von Präparat A+ lag sogar über dem von Präparat A. Aus den Ergebnissen wird gefolgert, dass die zusätzliche S/D-Behandlung bei Präparat A+ nicht zu einer modifizierten Antigenbindung führt, da sie alle Antikörperspezifitäten gleichermaßen betreffen müsste. Die Beeinflussung einer bestimmten Antikörperspezifität durch das S/D-Verfahren erscheint höchst unwahrscheinlich.

Der reduzierte Anti-HAV-Gehalt des Präparates A+ muss daher mit einem reduzierten Gehalt in den Plasmapools zusammenhängen. Dies würde sich anhand einer Anti-HAV-Bestimmung der für die Herstellung der Chargen verwendeten Plasmapools nachweisen lassen. Diese waren jedoch nicht mehr verfügbar.

Die Annahme wurde jedoch durch den Hinweis des Herstellers untermauert, dass neuere Chargen des Präparates niedrigere Anti-HAV-Gehalte aufweisen können, da hochtitrige Anti-HAV-Plasmen für die Produktion spezifischer Anti-HAV-Präparate ausgewählt und reserviert werden.

Der Einfluss der Plasmaherkunft wurde ebenfalls bei dem albuminhaltigen Präparat I beobachtet. Das Präparat enthielt im Vergleich zu anderen Präparaten einen sehr geringen Anti-HAV-Gehalt. Erklären lässt sich dies dadurch, dass das Präparat ausschließlich aus schwedischen Plasmen hergestellt wird. Epidemiologische Daten zeigen, dass die Inzidenz von Hepatitis A in Schweden sehr niedrig ist (NORDENFELT, 1992). Nach dessen Angaben besitzen nur ca. 6,6% der unter 40-jährigen Antikörper gegen das Hepatitis A Virus, bei den unter 20-jährigen nur 1%. Eine neuere Studie zeigte, dass nur 2% der nach 1950 geborenen Personen Antikörper besitzen. Andere Immunglobuline werden in der Regel aus Mischplasmen europäischer und amerikanischer Herkunft hergestellt und besitzen daher einen höheren Anti-HAV-Gehalt. In den europäischen Ländern beträgt die Prävalenz ca. 70% (BOTTIGER et al., 1997). Die Beschränkung der Plasmaherkunft auf eine bestimmte geographische Region kann das Antikörperspektrum der IVIG limitieren.

Die Beobachtung bestätigt jedoch auch, dass die Anti-HAV-Bestimmung in Immunglobulin-Präparaten mit dem angewandten ELISA richtig quantifiziert wurde, da die epidemiologische Situation der Spenderpopulation in Schweden richtig erfasst wurde. Das Präparat I stellt insofern eine Ausnahme zu anderen Präparaten dar, da deren Plasmen aus unterschiedlichen europäischen und amerikanischen Regionen bezogen und vereinigt werden. Die Daten belegen aber auch, dass es sich bei intravenöse Immunglobulinen um keine einheitliche Gruppe von Medikamenten handelt, die beliebig austauschbar sind.

Ein weitere Beobachtung, die auf den Einfluss der Plasmaherkunft hinweist, war der sehr hohe Gehalt an Anti-CMV-Antikörpern in zwei Chargen des Präparates M. Zumindest für eine Charge ließ sich anhand der Chargendokumentation belegen, dass für deren Produktion Plasmapools verwendet wurden, die auch zur Herstellung eines spezifischen Anti-CMV-Präparates dienten.

Andere Chargen wurden offensichtlich aus normalen Plasmen hergestellt und besaßen dementsprechend niedrigere Anti-CMV-Titer.

Vorschriften, die den max. Gehalt von Anti-CMV oder anderer Antikörperspezifitäten in IVIG regeln, existieren nicht. Fragwürdig bleibt jedoch, inwieweit die beobachteten Unterschiede im Antikörpergehalt mit einer gleichförmigen Herstellung in Einklang zu bringen sind. Die Ausführungen zeigen aber auch, dass Fehlinterpretationen hinsichtlich der F(ab)-Aktivität in normalen IVIG möglich sind, wenn die Herkunft bzw. die Eigenschaften der Plasmen unbekannt sind. Für den anwendenden Arzt sind solche Informationen in der Regel nicht zugänglich. Es wäre daher empfehlenswert, in die Monographie eine bestimmte Auswahl an klinisch relevanten Antikörperspezifitäten aufzunehmen, deren Gehalt deklariert werden sollte.

5.2 Analyse der Proteinzusammensetzung

5.2.1 SDS-PAGE: Einfluss der Virusinaktivierung/Eliminierung

Die zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungsmethoden ließen keine Veränderung der Proteinbandenmuster erkennen. Die Proteinzusammensetzung der IVIG wurde mittels SDS-PAGE vor und nach Einführung virusinaktivierender Maßnahmen durch Vergleich der Coomassie S gefärbten Bandenmuster untersucht. Dabei führte weder die S/D-Behandlung bei Präparat A+, H+ und M+, noch die Inkubation mit Fettalkoholen bei Präparat E+ zu einer Veränderung der Bandenmuster.

Bei dem unbehandelten Präparat C und dem zusätzlich nanofiltrierten Nachfolgepräparat C+ bestand der einzige Unterschied in der etwas stärkeren Intensität einer einzigen Bande bei sonst identischem Bandenmuster. Inwieweit dies eine generelle Eigenschaft des Altpreparates oder eine Besonderheit der untersuchten Charge darstellt, lässt sich aufgrund der Untersuchung der einzig zu Verfügung stehenden Charge nicht beurteilen. Erschwerend kommt hinzu, dass das Vorgängerpräparat als Lyophilisat, das Nachfolgepräparat jedoch in flüssiger Formulierung hergestellt wurde. Ein Einfluss der geänderten Formulierung kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

5.2.1.1 Zusätzliche Banden bei nicht modifizierten IVIG

Während die Virusinaktivierungsverfahren keinen Einfluss auf die beobachteten Bandenmuster zeigten, ließ sich deutlich der Einfluss der Herstellungsverfahren nachweisen. Die nicht modifizierten Präparatepaare H/H⁺ und M/M⁺ zeigten unter reduzierenden Bedingungen zwei Hauptbanden, die den L- bzw. H-Ketten der IgG-Antikörper entsprechen. Es wurden jedoch weitere Proteinbanden sichtbar, deren Molekulargewichte über 65 kD lagen. Zur Klärung von deren Herkunft wurden die Banden geblottet und die Blotmembran sowohl mit Anti-human IgG, als auch mit Anti-L-Ketten Antikörpern inkubiert. Die Bindung beider verwendeter Antikörper deutet darauf hin, dass die zusätzlichen Proteinbanden aus verschiedenen Kombinationen der L- und H-Ketten bestehen. Ursache hierfür ist vermutlich eine nicht vollständige Reduktion der die Ketten verbindenden Disulfidbrücken durch das in der SDS-PAGE verwendete Reduktionsmittel oder eine mögliche Reoxidation bereits gespaltener Disulfidbrücken. Die zusätzlichen Banden bei nicht modifizierten IVIG sind daher als methodisch bedingte Artefakte anzusehen. Dafür spricht auch, dass unter nicht reduzierenden Bedingungen diese Banden nicht mehr beobachtet werden konnten.

5.2.1.2 Zusätzliche Banden bei modifizierten IVIG

Im Unterschied zu den zusätzlichen Banden bei nativen IVIG werden die zusätzlichen Banden bei enzymatisch behandelten Präparaten durch die damit verbundene Fragmentierung der Moleküle verursacht. Dies zeigte sich besonders bei dem Trypsin-behandelten Präparat A und seinem S/D-behandelten Nachfolgepräparat A⁺. Beide Bandenmuster waren identisch, wiesen aber im Vergleich zu nicht enzymatisch behandelten IVIG intensiv gefärbte zusätzliche Banden zwischen denen der H- und L-Ketten und auch zusätzliche Banden unterhalb von 30 kD auf. Die Bindung von Anti-IgG-Antikörper und Anti-L-Ketten-Antikörper im Immunoblot bestätigte, dass diese Banden aus Antikörperprotein bestehen. Darüber hinaus wurde auch beschrieben, dass die Inkubation von IgG mit Trypsin zur Gewinnung von sogenannten tFab- und tFc-Fragmenten führt, die Ähnlichkeit mit Fab- bzw. Fc-Fragmenten nach Papainspaltung aufweisen (Lexikon der Immunologie, 1992).

Die enzymatische Behandlung führt zur teilweisen Fragmentierung der Antikörper und somit zu einem Präparat, das neben intakten Antikörpern auch Ak-Fragmente enthält. Während der Herstellung werden Aufreinigungsverfahren angewandt, die solche Fragmente entfernen sollen. Die Ergebnisse der SDS-PAGE zeigen jedoch, dass dies offensichtlich nur teilweise gelingt. Auch in der Fach- und Gebrauchsinformation des Präparates A ist ein Hinweis zu finden, dass das Präparat neben intakten Antikörpern weitere, nicht funktionelle Antikörper enthält. Angegeben wird beispielsweise, dass mindestens 1000 mg funktionell intaktes IgG in 1100 mg bis 1300 mg Gesamtprotein enthalten seien, dies entspricht 84,6% bis 90,9% des Gesamt-Ig-Proteins. Damit soll erreicht werden, dass der Anteil an intaktem IgG nach Rekonstitution des Lyophilisates ca. 50 mg/ml beträgt, wobei als intaktes IgG nach Herstellerangaben jener Anteil an IgG definiert ist, der an Protein A-Sepharose gebunden werden kann (Protein A besitzt, wie Fc-Rezeptoren, die Eigenschaft Antikörper der IgG-Subklassen 1, 2 und 4 an deren Fc-Teil zu binden).

Zusätzliche Banden wurden auch bei Präparatepaar E/E+ besonders in der nicht reduzierenden SDS-PAGE beobachtet. Diese werden als Folge des speziellen Herstellungsverfahrens (S-Sulfonierung) angesehen. Die S-Sulfonierung führt zur Bildung von Antikörperfragmenten. Nach GRONSKI (1983) bewirkt die S-Sulfonierung die Spaltung der Interketten-Disulfidbrücken, die für den Zusammenhalt der H- und L-Ketten verantwortlich sind. Die Intraketten-Disulfidbrücken seien dagegen aufgrund ihrer geschützten Lage im Antikörpermolekül für chemische Agenzien nur schwer zugänglich, so dass sie unter milden Reaktionsbedingungen kaum gespalten werden können.

Da nicht alle Interketten-Disulfidbrücken eines Moleküls gespalten werden, enthält das fertige IgG-Präparat eine Mischung aus verschiedenen Kombinationen von H- und L-Ketten. Die möglichen Kombinationen und die zu erwartenden Molekulargewichte sind in Abbildung 36 schematisch dargestellt (nach GRONSKI).

	MW ca.
	H_2L_2 150000
	H_2L_1 125000
	H_2 100000
	H_1L_1 75000
	H 50000
	L 25000

Abbildung 36 Mögliche Kombinationen schwerer und leichter Ketten nach Spaltung eines IgG-Antikörpermoleküls durch S-Sulfonierung (modifiziert nach GRONSKI).

Das unter nicht reduzierenden Bedingungen erhaltene Fragmentmuster des sulfonierten Präparates entsprach weitestgehend den oben dargestellten Kombinationsmöglichkeiten (Abbildung 8, Spur 6, Seite 75). In der SDS-PAGE konnten statt der theoretisch zu erwartenden sechs Banden jedoch nur vier differenziert werden. Die Ursache hierfür dürfte mit der relativ kurzen Trennstrecke der verwendeten Mini-Gele und der Porengröße (12,5%iges Gel) zusammenhängen. Damit ist eine sichere Differenzierung der Banden über ca. 100 kDa kaum möglich, da es zu Überlagerungen von Banden kommen kann.

Unabhängig davon zeigt die Untersuchung jedoch, dass das Verfahren der S-Sulfitolyse zu einem speziellen Produkt führt, das bereits in der Endformulierung in einer hochgradig fragmentierten Form vorliegt. In der nicht reduzierenden SDS-PAGE lässt sich das Präparat anhand des Fragmentierungsmusters daher eindeutig von anderen Immunglobulin-Präparaten unterscheiden. Die Integrität des Antikörpermoleküls wird durch die S-Sulfitolyse aufgehoben. Damit ist *in vitro* eine Reduktion sowohl der Antigenbindung als auch der Antikörperfunktionen verbunden. Dies bestätigte sich in allen durchgeführten Untersuchungen.

Nach GRONSKI (1982) handelt es sich bei der S-Sulfonierung um eine reversible chemische Modifizierung an den Interketten-Disulfidbrücken, die *in vivo* und unter bestimmten experimentellen Bedingungen wieder aufgehoben werden kann. *In vivo* soll eine Wiedervereinigung der Ketten stattfinden. Anhand von Fragmentierungsmustern in der SDS-PAGE und weiteren Untersuchungen zeigte GRONSKI (1982), dass eine Rekonstitution des durch S-Sulfonierung gespaltenen IgGs innerhalb 24 Stunden nach i.v.-Gabe im Kaninchen stattfindet. Weiter wird beschrieben, dass die Intraketten-Disulfidbrücken – welche für die Stabilisierung der IgG-Domänen verantwortlich gemacht werden – teilweise durch die Sulfitolyse gespalten werden können. Damit sei eine Strukturveränderung der Antikörper-Bindungsstelle verbunden, die zur Folge hat, dass die spezifischen Bindungseigenschaften reduziert werden.

Durch die Rekonstitution sollen jedoch auch die Intraketten-Disulfidbrücken wieder hergestellt werden. GRONSKI belegt dies anhand der zeitlichen Veränderung der Anti-Tetanustoxoid-Aktivität im Kaninchen nach i.v.-Gabe von humanem IgG und einem daraus hergestellten sulfoniertem IgG. Während anfänglich der Titer des gespaltenen IgGs deutlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle erniedrigt war, erfolgte innerhalb der 24 Stunden eine deutliche Zunahme der gemessenen Titer, die sogar während der nächsten 4 Tage über dem des Kontroll-IgGs lagen. Die Kurve zeigt aber auch, dass der Titer des sulfonierten Präparates rascher abfällt. Während am fünften Tag nach Applikation beide Titer identisch waren, lagen die Titer am sechsten Tag bereits unterhalb des Kontroll-IgGs. Dies deutet auf einen beschleunigten Abbau und damit auf eine kürzere Plasma-Halbwertszeit des Präparates hin.

Die Rekonstitution kann *in vitro* durch die Behandlung des sulfitolysierten IgG mit SH-Gruppen tragenden Substanzen, wie z.B. Mercaptoethanol oder Dithiothreitol und nachfolgender Oxidation mit Sauerstoff durchgeführt werden (MASUHO, 1977). Nach dessen Untersuchungen mit Anti-Tetanus-Gammaglobulin ist eine Rekonstitution möglich, wobei auch die mit dem Fc-Teil verbundenen Funktionen wiederhergestellt werden sollen. In den eigenen Untersuchungen wurden solche Rekonstitutionsversuche nicht durchgeführt.

Der Vergleich zwischen virusinaktiviertem und unbehandeltem Präparat sollte am Endprodukt durchgeführt werden, ohne dabei die Eigenschaften der Antikörper durch zusätzliche Manipulationen zu beeinflussen. Ein weiterer Aspekt war, dass mit dem sulfitolysiertem Präparat ein IgG-Material zur Verfügung stand, das die Überprüfung der angewandten Methoden (besonders bei funktionellen Prüfungen) hinsichtlich ihrer Sensitivität für denaturiertes IgG ermöglichte.

Es muss betont werden, dass ein Vergleich mit anderen Präparaten hinsichtlich der Bestimmung von Antikörperaktivitäten und -funktionen aufgrund der besonderen Behandlung und der damit verbundenen Eigenschaften des Präparates nur bedingt möglich ist. Auch sollte die klinische Wirksamkeit des Präparates nicht aus den *in vitro* ermittelten Daten abgeleitet werden, da eine vorherige Rekonstitution der Antikörpermoleküle bei den Versuchen nicht durchgeführt wurde.

Unabhängig davon zeigten die Untersuchungen aber, dass die SDS-PAGE eine geeignete, technisch einfach durchzuführende und aussagekräftige Methode zum Nachweis der Identität von IVIG ist und in die Monographie für IVIG aufgenommen werden sollte.

5.2.2 IgG-Subklassenbestimmung

Als weiterer Parameter der Proteinzusammensetzung wurde die IgG-Subklassenverteilung der IVIG-Präparationen vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte mittels radialer Immundiffusion bestimmt. Hierzu wurden die Präparate jeweils paarweise auf Immundiffusionsplatten getestet, die mAk gegen die zu bestimmenden IgG-Subklassen enthielten. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass die IgG-Subklassen-Zusammensetzung nicht durch die zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungsverfahren verändert wurde.

Jedoch zeigte sich auch hier, dass IVIG-Präparate keine einheitlichen Produkte darstellen. Die Präparate wiesen teilweise unterschiedliche Konzentrationen der vier IgG-Subklassen auf. Das Trypsin-behandelte Präparat A und A+ besaß einen relativ hohen Anteil der Subklassen IgG1 und IgG2, während IgG3 nicht oder nur in Spuren nachweisbar war. Der IgG4-Gehalt lag im Vergleich mit anderen Präparaten im mittleren Bereich.

Der stark reduzierte IgG3-Gehalt wird auf die Trypsin-Behandlung zurückgeführt. Es ist bekannt, dass IgG3 aufgrund der langen „Hinge-Region“ besonders empfindlich auf eine enzymatische Behandlung reagiert. SPIEGELBERG (1972) gibt an, dass IgG3 fünf Disulfidbrücken besitzt, welche die H-Ketten miteinander verbinden. Die Proteasenempfindlichkeit des IgG3 wird als Grund für deren im Vergleich zu anderen Subklassen (ca. 20 Tage) kürzeste Serum-Halbwertszeit von 9-10 Tagen angesehen.

Für eine Beteiligung der Proteasen an den unterschiedlichen IgG-Subklassengehalten spricht auch die Beobachtung von SKVARIL (1986). Er isolierte den intakten Antikörperanteil Plasmin-behandelter Produkte und analysierte deren IgG-Subklassen ebenfalls mittels radialer Immundiffusion auf Agarosegel-Platten. Auch er konnte bei einem Produkt (Rhodiglobin, Mérieux SA Lyon) die Subklasse IgG3 nicht mehr nachweisen, während er eine Anreicherung der Plasmin-resistenteren Subklasse IgG2 in dem Präparat beobachtete.

Es werden jedoch auch andere Ursachen für die unterschiedlichen Subklassenzusammensetzungen der IVIG angegeben: STEPHAN (1975) begründet die Reduktion der IgG3-Subklasse bei β -Propiolacton-behandelten Präparaten durch einen speziellen Absorptionsschritt vor der Plasma-Fraktionierung. Dies könnte auch die bei Präparat K gemessenen niedrigen IgG3-Gehalte erklären, da das Präparat vom gleichen Hersteller produziert wird.

Ebenfalls niedrige IgG3-Gehalte wurden bei den S-sulfonylierten Präparaten E und E+ gemessen. Hierfür wird die bei der Herstellung angewandte S-Sulfonylierung verantwortlich gemacht. GRONSKI (1983) untersuchte die Subklassenverteilung bei S-sulfonylierten IgG durch radiale Immundiffusion mittels zweier spezifischer Antiseren, wobei als Referenzmaterial ein WHO Referenz-Serum-Pool eingesetzt wurde. Dabei zeigte sich, dass die S-Sulfonylolyse für die reduzierte IgG3-Subklasse verantwortlich ist, andererseits aber auch, dass der Prozess der Sulfonylolyse in bestimmtem Rahmen umkehrbar ist. Die in vivo-Rekonstitution erfolgte durch Injektion in zwei Kaninchen. Sie bekamen entweder sulfonyliertes-IgG (S-IgG) oder aber rekonstituiertes IgG (R-IgG) i.v. injiziert.

Anschließend wurden in bestimmten Zeitintervallen Blutproben entnommen und die Immunglobulinfraktionen durch Caprylsäure- und Ammoniumsulfat-Präzipitation isoliert. Als Ergebnis beschreibt GRONSKI, dass die Subklassenverteilung des S-IgG in etwa der des WHO-Referenzmaterials entspricht, aber einen reduzierten IgG3-Anteil aufweist, der aber nach Rekonstitution der gespaltenen Disulfidbrücken wieder auf normale IgG3-Level zurückkehrt.

GRONSKI führt den reduzierten IgG3-Gehalt bzw. das Fehlen von IgG3 nicht auf eine Entfernung oder Zerstörung der Antikörper zurück, sondern auf eine reversible Konformationsänderung der antigenetischen Bereiche im Fc-Teil, die von den Anti-IgG3 Antiseren erkannt werden. Als Beleg dafür führt er den Anstieg der IgG3-Titer an, der bei zunehmender Wiederherstellung der Moleküle eintrat.

Er weist jedoch auf die Möglichkeit einer leichten Modifizierung der Moleküle hin, die mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Proteasen verbunden sein kann. Dies wird als Ursache für die verkürzte Halbwertszeit des sulfonierten IgGs auf 15 Tage angenommen. Die Modifikationen seien nur schwach ausgeprägt, was auch die fehlende Neoantigenität der Moleküle erklären würde. Nicht sicher ist GRONSKI, ob die Empfindlichkeit gegenüber Proteasen eventuell vor und während der Rekonstitution erhöht sei. Experimente, die das eine oder andere belegen könnten, lägen nicht vor.

Niedrige IgG3-Antikörpergehalte wurden ebenfalls bei Präparat G gefunden. Präparat G stellt ein nicht modifiziertes IVIG dar, das im Vergleich zu anderen nicht modifizierten Präparaten durch einen niedrigeren IgG3-Gehalt auffällt. Der reduzierte Gehalt lässt sich in diesem Fall nicht durch eine Modifikation der H-Ketten erklären. Eine selektive Abreicherung von IgG3 in bestimmten Herstellungsschritten oder die Verwendung von Plasmapools mit niedrigem IgG3-Spiegel könnten die Ursache sein. Bei der Herstellung werden bestimmte Verfahren angewandt, die eine Aggregatbildung verhindern oder aber vorhandene Aggregate eliminieren sollen. Hierbei wäre es ebenfalls möglich, dass gleichzeitig auch IgG3 entfernt wird.

Bei der IgG-Subklassenbestimmung fiel Präparat B besonders auf, da es nur mit den Anti-IgG3 Antikörpern der Immundiffusionsplatten reagierte. Mit durchschnittlich 5,3 mg/ml IgG3 enthielt es die höchste gemessene Konzentration aller untersuchten Präparate. Die Herstellung von Präparat B beinhaltet eine Behandlung mit Pepsin, so dass das IVIG hauptsächlich F(ab)₂-Anteile von Antikörpern enthält. SKVARIL (1986) weist darauf hin, dass die IgG-Subklassen-Zusammensetzung von F(ab)₂-, Fab- und Fc-Fragmenten nicht bestimmbar ist, da die subklassenspezifischen Antigen-Determinanten fehlen, die für eine Reaktion mit subklassenspezifischen Antikörpern notwendig sind. Damit wäre zwar die fehlende Reaktion mit den Antikörpern gegen die Subklassen IgG1, 2 und 4 zu erklären. Die beobachtete Präzipitation mit mAk gegen IgG3 ist damit jedoch nicht erklärbar. Es ist bekannt, dass die Behandlung von Antikörpern mit Pepsin zu F(ab)₂-Fragmenten und zu unterschiedlich fragmentierten Bruchstücken des Fc-Teils führt. Möglicherweise bindet der mAk im Gel der Immundiffusionsplatte an Bruchstücke, die noch intakte Antigen-Determinanten enthalten, die zur Bindung des mAk notwendig sind. Dafür spricht auch, dass das IgG3-Molekül von allen IgG-Subklassen die längsten H-Ketten besitzt.

HEINER (1986) untersuchte ebenfalls die IgG-Subklassen-Zusammensetzung von IVIG. Er berichtet darüber, dass er und andere eine Änderung im IgG3-Gehalt von reduzierten und alkylierten Präparaten gefunden haben. Des weiteren weist der Autor darauf hin, dass in Pepsin-behandelten Präparaten fast alle IgG-Subklassen denaturiert werden. Er fand in den meisten Präparaten einen IgG4-Gehalt, der ungefähr nur der Hälfte der erwarteten Menge entsprach. Der IgG4-Gehalt variierte jedoch zusätzlich von Charge zu Charge.

5.2.3 Klinische Relevanz der IgG-Subklassenverteilung

Abweichungen der Serum-IgG-Subklassenkonzentrationen vom Referenzbereich werden mit verschiedenen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht (MORELL, 1994). Nach SCHUR et al. (1970) besteht ein Zusammenhang zwischen selektivem Mangel an IgG2 und rezidivierenden bakteriellen Infektionen. Ein selektiver IgG2 Mangel manifestiert sich aber auch durch gehäuftes Auftreten viraler Infektionen.

Niedrige IgG2-Konzentrationen wurden bei Patienten mit Infektionen der oberen Atemwege und bei bronchopulmonalen Infektionen gefunden. Ein IgG3-Mangel wurde bei virusbedingten Harnwegsinfektionen beobachtet (OCHS, 1987). BECK und HEINER (1981) vermuten einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen von IgG4 und dem Auftreten von Atemwegsinfektionen: Von 422 Serumproben zeigten vier Spender mit IgG4-Mangel das Bild einer schweren sinopulmonaren Infektion.

Der Ausgleich eines IgG-Subklassenmangels stellt eine wichtige Indikation für IVIG dar. Es ist daher wichtig zu wissen, welche IgG-Subklassen-Zusammensetzung IVIG besitzen. Wie bereits erwähnt, konnten in den verschiedenen IVIG-Präparaten unterschiedliche Gehalte einzelner IgG-Subklassen gemessen werden. Inwieweit dabei ein reduzierter Gehalt oder das Fehlen einer Subklasse bei bestimmten IVIG-Präparaten von klinischem Belang ist, bleibt offen. Nach der Monographie für IVIG muss die IgG-Subklassenverteilung lediglich deklariert werden, eine bestimmte Anforderung an die Zusammensetzung besteht zur Zeit nicht. Die Forderung nach einer definierten Subklassenzusammensetzung wird auch deshalb erschwert, da die Subklassen IgG3 und IgG4 bereits in der Spenderpopulation die höchste Variabilität aufweisen und deren klinische Relevanz bisher nicht eindeutig gesichert ist.

5.3 Bestimmung spezifischer Antikörpergehalte in IVIG

Mittels ELISA wurden die Antikörpergehalte der IVIG gegen Parvovirus B19, HAV, HBsAg, VZV und CMV vergleichend bestimmt. Antikörpertiter gegen Rötelnvirus wurden mittels HAHT, Antikörper gegen Staphylolysin und Streptolysin mittels HHT bestimmt. Für die Auswahl der untersuchten Antikörperspezifitäten war deren Bedeutung für die Virussicherheit der Präparate (Parvovirus B19, HAV, HBsAg) oder deren klinische Relevanz (CMV, VZV) ausschlaggebend. Insgesamt lassen die Ergebnisse aus den verschiedenen Antikörpergehalts-Bestimmungen erkennen, dass die Antigenbindungseigenschaften der F(ab)-Region der Antikörper nicht durch zusätzliche Virusinaktivierungsschritte beeinflusst wurden.

Die folgende Übersicht (Tabelle 48) zeigt die Veränderungen der Antikörperaktivitäten nach Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungsmaßnahmen bei Präparatepaaren, die eine statistische Auswertung erlaubten. Das Präparatepaar C/C+ wurde nicht in der Übersicht aufgeführt, da nur eine Charge des Präparates C zur Verfügung stand. Des weiteren konnten keine Daten zum Anti-Staphylolysin und Anti-Streptolysin-Antikörpergehalt des Präparates A+ erhoben werden, da das Präparat zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch nicht verfügbar war.

Tabelle 48 Übersicht über signifikante Veränderungen der Antikörperaktivität gegen verschiedene Erreger vor und nach Einführung virusinaktivierender Herstellungsschritte verschiedener IVIG.

IVIG-paare	Antikörper gegen							
	PVB19	HAV	HBsAg	VZV	CMV	Staph.	Strep.	Röteln
A/A+	n.s.	A+↓	n.s.	n.s.	A+↑	*	*	A+↑
E/E+	n.s.	n.s.	E+↑	n.s.	E+↓	n.s.	n.s.	n.s.
H/H+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M/M+	M+↑	n.s.	n.s.	M+↑	n.s.	n.s.	M+↑	n.s.

↑ = signifikant erhöht, ↓ = signifikant erniedrigt

n.s. = kein signifikanter Unterschied

* = Vergleichspräparat war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht verfügbar

Wie die Übersicht zeigt, blieb die Höhe der meisten Antikörpergehalte nach Einführung der Virusinaktivierungsverfahren unverändert. Ausnahmen waren der niedrigere Anti-HAV-Gehalt bei Nachfolgepräparat A+ und der niedrigere Anti-CMV-Gehalt bei Präparat E+. Erhöhte Antikörpergehalte wurden dagegen nur bei den virusinaktivierten Nachfolgepräparaten festgestellt. Möglicherweise kann dies auf die Verwendung von Plasmapools mit höherem Gehalt spezifischer Antikörper oder auf eine beginnende Degradation der älteren Vorläuferpräparate zurückgeführt werden.

Die erniedrigte Anti-HAV-Aktivität bei dem S/D-behandelten Präparat A+ kann, wie bereits beschrieben, auf die Verwendung von Plasmapools mit niedrigerem Anti-HAV-Gehalt zurückgeführt werden.

5.3.1 Anti-Parvovirus B19-Gehalt in IVIG

Die Untersuchungen zeigten, dass IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 in allen untersuchten Präparaten vorhanden waren. Jedoch wurden zum Teil beträchtliche Unterschiede im Antikörpergehalt zwischen den Präparaten verschiedener Hersteller festgestellt. Dies wurde auch von DOCKRELL (1996) beschrieben. Er untersuchte eine geringere Anzahl IVIG-Chargen (insgesamt 11 Chargen dreier Hersteller), dabei wies ein Präparat eines Herstellers einen deutlich höheren Anti-Parvovirus B19-Gehalt auf.

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass die Gruppe der chemisch oder enzymatisch modifizierten Immunglobuline im Durchschnitt deutlich niedrigere Anti-Parvovirus B19-Aktivitäten besaßen. Als mögliche Ursachen kamen in Frage: Ein tatsächlich niedriger Antikörpergehalt der Präparate oder aber Probleme beim ELISA-Nachweis der Antikörper aufgrund der durchgeführten Antikörpermodifikation.

Um dies abzuklären, wurden die Plasmapools der Immunglobuline ebenfalls auf ihren Anti-Parvovirus B19-Gehalt hin untersucht. Es zeigte sich, dass Plasmapools von modifizierten und nicht modifizierten Präparaten ähnlich hohe Anti-Parvovirus B19-Gehalte besaßen. Dieser Befund stimmt mit der Kenntnis überein, dass das Parvovirus B 19 ubiquitär verbreitet ist. Nach Literaturangaben beträgt die Serokonversionsrate bei Erwachsenen in Deutschland 40-60% (SCHWARZ, 1987, 1990). In anderen Ländern liegt die Serokonversionsrate in ähnlichen Bereichen, so dass allzu große Unterschiede im Anti-Parvovirus B19-Gehalt zwischen den Plasmen aus anderen Ländern unwahrscheinlich sind (COUROUCE, 1984; ANDERSON, 1986; COHEN, 1988). Hinzu kommt, dass die meisten Hersteller die verwendeten Plasmen aus unterschiedlichen Regionen (Europa und Amerika) beziehen und diese später vereinigt werden. Geographisch bedingte Unterschiede werden somit weitgehend ausgeglichen. Die Ursache für die unterschiedlich hohen Anti-Parvovirus B19-Gehalte der untersuchten Präparate lässt sich daher nicht auf unterschiedlich hohe Gehalte in den Ausgangsmaterialien (Plasmapools) zurückführen. Sie beruhen damit wahrscheinlich auf den Folgen der chemischen oder enzymatischen Modifizierung der IVIG.

Dies beeinflusst entweder das Bindungsverhalten der Antikörper mit dem Antigen der ELISA-Platten und/oder die Bindung des zur Detektion verwendeten enzymgekoppelten Nachweisantikörpers.

5.3.1.1 Bedeutung der Parvovirus B19-Ak für die Virussicherheit von IVIG

Informationen über den Anti-Parvovirus B19-Antikörpergehalt in IVIG sind notwendig, da das Virus nicht durch die üblichen Virusinaktivierungsverfahren inaktiviert werden kann. Es wird daher diskutiert, dass die Virussicherheit der Präparate durch einen ausreichend hohen Anti-Parvovirus B19-Antikörpergehalt erhöht werden kann. Es ist davon auszugehen, dass die nach einer Infektion erworbenen Antikörper virusneutralisierende Wirkung besitzen (SCHWARZ et al., 1990; KURTZMAN et al., 1989). Darauf weisen verschiedene Befunde hin. So lässt sich mit beginnender Antikörperproduktion, die etwa 10-14 Tage nach Infektion eintritt, kein Virus mehr im Blut nachweisen (BROWN et al., 1994). Die Patienten entwickeln wahrscheinlich eine lebenslange Immunität, da IgG-Antikörper noch Jahre nach einer Infektion im Blut nachgewiesen werden können. Für die virusneutralisierende Wirkung spricht ferner, dass Reinfektionen bei Personen mit intaktem Immunsystem selten sind (Centers for Disease Control, 1989). Darüber hinaus wurde vereinzelt berichtet, dass Immunglobuline zur Therapie bei kritischen Parvovirus B19-Infektionen mit Erfolg eingesetzt wurden (KURTZMAN et al., 1989). Die Höhe eines schützenden Antikörpertiters ist bisher nicht bekannt, da bislang keine Zelllinie mit B19 infiziert werden konnte. BLÜMEL (2002) stellte jedoch kürzlich einen Infektionstest mit KU812Ep6-Zellen vor, der zukünftig helfen könnte diese Frage zu beantworten.

5.3.2 Parvovirus B19-DNA in Plasmapools und IVIG

Wie sich in den eigenen Untersuchungen gezeigt hat, konnte in knapp der Hälfte (47%), aller untersuchten Plasmapoolproben Parvovirus B19-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. Diese Plasmapools dienten als Ausgangsmaterial für die Herstellung der untersuchten IVIG-Chargen. Es wurde daher angenommen, dass in den zugehörigen Endprodukt-Chargen ebenfalls Parvovirus B19-DNA gefunden werden könne. Dies konnte nicht bestätigt werden. In keiner der 152 untersuchten Endprodukt-Chargen konnte Parvovirus B19-DNA nachgewiesen werden.

SALDANHA (1996) fand dagegen in 3 von 15 untersuchten IVIG-Proben Parvovirus B19-DNA. Die 3 positiven Proben stammten dabei vom gleichen Hersteller. Die Befunde an den Endprodukten sollten durch Austausch der Proben abgeklärt bzw. bestätigt werden. Ein Einfluss PCR-hemmender Substanzen in den Präparaten im eigenen Testsystem konnte durch Spiking-Versuche ausgeschlossen werden. Hierzu wurde eine positive Plasmapoolprobe 1:40 mit allen IVIG-Proben verdünnt. Weiterhin wurden Standards und Kontrollen mitgeführt, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Eine mögliche Erklärung für die negativen Ergebnisse bei den Endprodukten wäre, dass das Virus während der Plasma-Fraktionierung in anderen Fraktionen angereichert wird, die nicht zur Produktion von IVIG verwendet werden. In diesem Fall sollte das Virus in anderen Produkten wiederzufinden sein, die aus den nicht verwendeten Fraktionen hergestellt werden. Studien, die diese Annahme bestätigen könnten, sind jedoch nicht bekannt.

5.3.3 Anti-Röteln-HAHT

Nach Einführung des S/D-Verfahrens wurde in den Chargen des Präparates A+ ein signifikant höherer Anti-Röteln-Gehalt gemessen als in unbehandelten Chargen des Vorgängerpräparates ($A^+ = 1216 \text{ IU/ml}$, $A = 790 \text{ IU/ml}$). Das S/D-behandelte Nachfolgepräparat wurde jedoch erst nach Abschluss der Anti-Röteln-Untersuchungen zur Zulassung eingereicht, so dass die Chargen nachgetestet werden mussten. Der verwendete Hämagglutinations-Hemmungstest besitzt eine Präzision von $\pm$ einer Titerstufe, so dass bei nachträglichen Messungen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Ergebnisse um $\pm$ eine Titerstufe variieren.

In gleicher Weise gilt das oben gesagte für das Präparat H. Auch hier standen die Proben erst nachträglich zur Verfügung, so dass die Proben nicht gleichzeitig getestet werden konnten. Da zwischenzeitlich der Gehalt des Anti-Röteln-Standardserums vom Testkit-Hersteller von 19 IU/ml auf $13,1 \text{ IU/ml}$ umgestellt wurde, ergaben sich bei der Berechnung des Anti-Röteln-Gehaltes der IVIG-Proben unterschiedliche Ergebnisse.

Ein später durchgeführter Test, in dem je vier S/D-behandelte und unbehandelte Chargen des Präparates H bzw. H+ parallel getestet wurden, zeigte aber, dass beide Präparate den gleichen Anti-Röteln-Titer besaßen, so dass ein Einfluss der Virusinaktivierung ausgeschlossen werden kann.

Weitere S/D-behandelte Präparate (I, L und M+) wiesen Anti-Röteln-Gehalte in gleicher Höhe auf.

5.3.3.1 Grenzen des Anti-Röteln-HAHT

Die Bestimmung des Anti-Röteln-Titers mittels HAHT wird von einigen Herstellern angewandt, um die in der Monographie für IVIG geforderte dreifache Anreicherung der Antikörper im Endprodukt gegenüber dem Ausgangsmaterial zu belegen. Um die Ergebnisse der eigenen Messungen mit denen der Hersteller vergleichen zu können, wurde die gleiche Bestimmungsmethode gewählt. Zur Messung des Anti-Röteln-Titers wird die Probe ausverdünnt, bis deren Antikörperkonzentration nicht mehr ausreicht die Erythrozyten-Agglutination durch das zugesetzte Virus zu verhindern. Nach Angaben des Testherstellers und eigener Validierungsstudien kann der Titer bei wiederholter Testdurchführung um $\pm$ eine Verdünnungsstufe variieren. Das bedeutet, dass bei wiederholter Bestimmung einer Probe mit bekannter Aktivität (z.B. 608 IU/ml) auch Ergebnisse erhalten werden können, wonach die gleiche Probe 308 IU/ml oder 1216 IU/ml enthält. Zwischenwerte werden aufgrund der 1:2 Titration nicht erhalten. Der Test ist deshalb nicht geeignet Veränderungen am Antikörpermolekül nachzuweisen, die die Antigenbindungsfähigkeit der Antikörper nur moderat beeinflussen.

5.4 Funktionelle Prüfung der IVIG

Der Einfluss der Virusinaktivierungsverfahren auf wichtige Antikörperfunktionen, wie die Aktivierung des Komplementsystems, die Bindung an Fc-Rezeptoren und die phagozytosefördernde Eigenschaft von IVIG wurden mittels des in der Monographie für IVIG geforderten Fc-Funktionstests, dem Fc-Rezeptor-Bindungstest sowie einem Phagozytostest geprüft.

5.4.1 Fc-Funktionstest

5.4.1.1 Einfluss der Virusinaktivierung/Eliminierung

Ein negativer Einfluss des S/D-Virusinaktivierungsverfahrens im Fc-Funktionstest konnte nicht beobachtet werden. Die S/D-behandelten Präparate (A+, H+, M+) zeigten die gleiche komplementaktivierende Aktivität wie ihre unbehandelten Vorgängerpräparate. Auch weitere S/D-behandelte Präparate (L und I), für die kein unbehandeltes Vorgängerprodukt vorhanden war, besaßen im Vergleich zu einem Referenzpräparat eine normale Fc-Funktion. Die zur Virusinaktivierung bei Präparat E+ eingeführte Fettalkoholbehandlung führte ebenfalls zu keiner veränderten Fc-Funktion. Der Einfluss der Nanofiltration zur Viruselimination bei Präparat C+ konnte statistisch nicht ausgewertet werden, da nur eine Charge des Vorgängerpräparates untersucht wurde. Diese erreichte einen mittleren Fc-Index von 97%, während nanofiltrierte Chargen des Präparates (n=10) einen Fc-Index von durchschnittlich $81\% \pm 18$ erreichten.

5.4.1.2 Einfluss der Herstellungsverfahren

Im Vergleich zu anderen S/D-behandelten Präparaten fiel das Präparat A+, als auch das Vorgängerpräparat A, durch einen um ca. 16% reduzierten Fc-Index auf. Als Ursachen hierfür kommen in Frage: 1. Die Trypsin/Chymotrypsin-Behandlung führt, wie sich in der SDS-PAGE zeigte, zu einer teilweisen Fragmentierung der Antikörper. 2. Das Präparat enthält nur sehr geringe Mengen an IgG3, das neben IgG1 hauptsächlich an der Komplementaktivierung beteiligt ist. Einige Aspekte sprechen jedoch dafür, dass die reduzierte Fc-Aktivität bei dem Präparatepaar A/A+ ursächlich die Folge der Trypsin/Chymotrypsin-Behandlung ist:

1. Das nicht modifizierte Präparat G erreichte trotz des ebenfalls niedrigen IgG3-Gehaltes (0,7 mg/ml) einen Fc-Index von 100%.
2. Aufgrund des niedrigen Anteils von IgG3 am Gesamt-IgG (im WHO-Serum ca. 6,5%) dürfte dessen Einfluss auf das Testergebnis nur gering sein.

Die Bedeutung des Herstellungsverfahrens für die Qualität der Immunglobuline zeigte sich an der verminderten Fc-Funktion, die bei allen chemisch oder enzymatisch modifizierten Präparaten zu beobachten war. Dabei ist zu bemerken, dass das Ausmaß der Fc-Funktionseinschränkung von den verwendeten Proteasen und den gewählten Reaktionsbedingungen und damit vom Grad des Fc-Verlustes abhängig ist. Die verschiedenen Proteasenbehandlungen ließen eine abgestufte Verdauung bis hin zum Verlust des Fc-Teils erkennen. Das Pepsin/pH4-behandelte Präparat D zeigte noch normale Fc-Funktion, während das Trypsin-behandelte Präparatepaar A/A+ bereits eine verminderte Fc-Funktion aufwies. Die Pepsin-Behandlung bei Präparat B führte dagegen zum vollständigen Verlust der Fc-Funktion.

5.4.1.3 Bedeutung der Röteln-Ak für den Fc-Funktionstest

An der Komplementaktivierung im Fc-Funktionstest sind ausschließlich Anti-Röteln-Antikörper beteiligt. Das Ziel der antikörpervermittelten Komplementaktivierung ist es, bestimmte Eiweißkomponenten des Komplementsystems auf der Oberfläche der zu eliminierenden Bakterien oder Zellen abzulagern, die letztlich die Bildung von Poren in der Bakterien- oder Zellmembran verursachen, was deren Tod durch osmotisch bedingte Lyse zur Folge hat. In dem Fc-Funktionstest wird diese in der Immunabwehr wichtige Funktion der Antikörper simuliert, indem als Zielzellen Erythrozyten verwendet werden, die mit Röteln-Antigen beschichtet wurden. Die Aktivierung des aus Meerschweinchenserum stammenden Komplements setzt dabei als ersten limitierenden Schritt die spezifische Bindung der Antikörper an das Röteln-Antigen voraus.

Es ist bekannt, dass die erste Komplementkomponente C1 gleichzeitig mit den Fc-Teilen von mindestens zwei IgG-Molekülen reagieren muss, um durch eine Konformationsänderung in die enzymatisch aktive Form überzugehen (ABBAS, 1994). Die auf der Erythrozytenmembran gebundenen Antikörper müssen daher in einer bestimmten Dichte vorliegen, bzw. einen räumlichen Abstand zueinander besitzen, der wiederum von der Anti-Röteln-Antikörperkonzentration abhängig ist.

Anhand der Daten aus der Anti-Röteln-Bestimmung konnte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der verminderter Fc-Funktion bei chemisch oder enzymatisch modifizierten Präparaten und dem Anti-Röteln-Gehalt besteht. Das folgende Diagramm (Abbildung 37) zeigt den Anti-Röteln-Gehalt der untersuchten Präparate und die Ergebnisse aus dem durchgeführten Fc-Funktionstest.

Das Diagramm wurde aus den Daten der IVIG-Chargen erstellt, an denen beide Bestimmungen durchgeführt wurden. Außerdem wurde auf die Darstellung der Präparate H und J verzichtet, da deren Anti-Röteln-Bestimmung zu einem späteren Zeitpunkt und gegen einen anderen Standard (13,1 statt 19,0 IU/ml) stattfand.

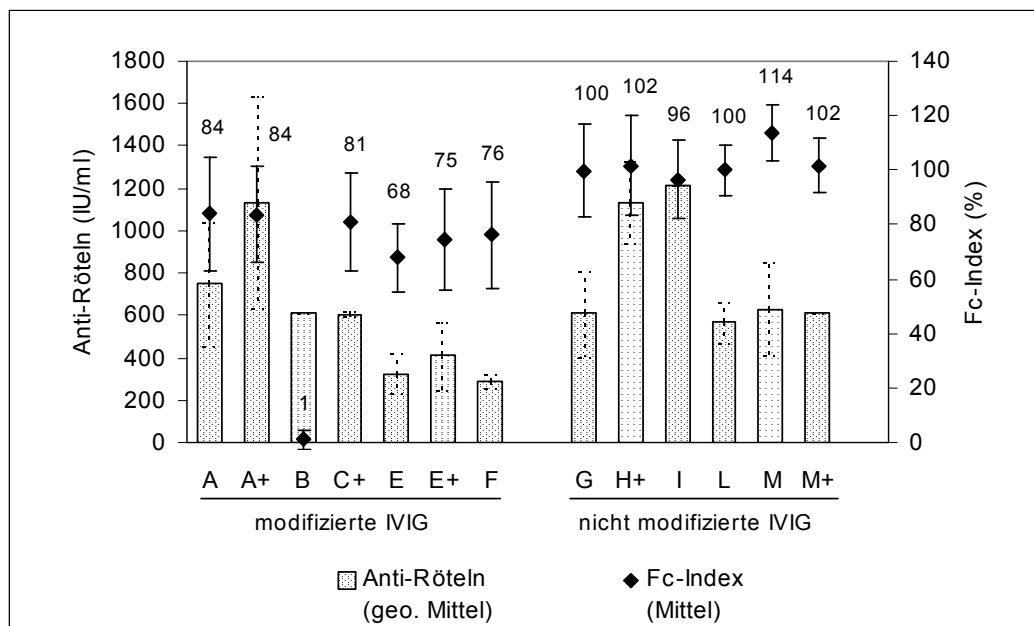


Abbildung 37 Zusammenhang zwischen Anti-Röteln-Gehalt (Balken) und den Ergebnissen des Fc-Funktionstests (Rauten) verschiedener IVIG-Präparationen (Fehlerbalken = einfache Standardabweichung).

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, kann kein direkter Zusammenhang zwischen dem Anti-Röteln-Gehalt der Probe und den Ergebnissen des Fc-Funktionstests hergestellt werden. Nicht modifizierte IVIG, wie die Präparate G, L oder M/M+ besitzen Anti-Röteln-Gehalte, die mit modifizierten Produkten, wie Präparat A, B oder C+ vergleichbar sind. Trotzdem erreichten sie einen Fc-Index von ca. 100%.

Die Vorschrift zur Durchführung des Fc-Funktionstests verlangt, dass jede Probe in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (30 mg/ml und 40 mg/ml Gesamtprotein) getestet wird. Ein Vergleich der Fc-Indices zeigte jedoch, dass bei beiden Konzentrationen in etwa gleiche Fc-Indices erreicht wurden. Dies spricht für einen ausreichend hohen Gehalt von Anti-Röteln-Ak in den IVIG-Präparaten, um das Röteln-Antigen auf den beschichteten Erythrozyten abzusättigen.

Es wurde erwartet, dass das Präparat F durch den Zusatz von ca. 6 mg/ml IgM (ca. 12% des Gesamt-Ig) einen höheren Fc-Index erreicht, da IgM eine starke komplementaktivierende Kapazität besitzt. Ein Fc-Index von 76% zeigte jedoch, dass Präparat F entgegen dieser Annahme eine verminderte Fc-Funktion besaß. Die Behandlung des Präparates mit β -Propiolacton beeinflusst damit offensichtlich nicht nur die funktionellen Eigenschaften von IgG, sondern auch die von IgM.

5.4.2 Fc-Rezeptor-Bindungstest

Der Fc-Rezeptor-Bindungstest wurde als neue Methode entwickelt, um die Fc-Funktion der Immunglobulin-Präparate zu untersuchen. Der Test basiert auf der Fc-Teil abhängigen Interaktion der IgG-Antikörper mit den Fc-Rezeptoren der THP-1-Zelllinie. Der Fc-Rezeptor-Bindungstest bietet gegenüber dem Fc-Funktionstest – der wegen der Beschichtung der Erythrozyten mit Röteln-Antigen auf die Prüfung rötelnspezifischer Antikörper beschränkt bleibt – den Vorteil, antigenunabhängig zu sein.

5.4.2.1 Einfluss der Virusinaktivierung/Eliminierung

Bei drei der fünf untersuchten Präparatepaare (A/A+, H/H+, M/M+) wurden die Nachfolgeprodukte mittels S/D-Verfahren virusinaktiviert. Es konnte kein Einfluss der S/D-Behandlung auf die Fc-Bindung bei den Präparatepaaren H/H+ und M/M+ festgestellt werden. Bei dem Präparatepaar A/A+ war ein signifikanter Unterschied zugunsten des S/D-behandelten Präparates A+ festzustellen (A+ = 98,8%, A = 90,9%). Es erscheint aber unwahrscheinlich, dass die höhere Fc-Bindung durch die S/D-Behandlung bedingt wird. Im komplementabhängigen Fc-Funktionstest verhielten sich nämlich beide Proben gleich. Möglicherweise spielt hier eine unterschiedliche Lagerungsstabilität der Immunglobuline eine Rolle. Es ist bekannt, dass die Fc-Funktion der Immunglobuline mit zunehmender Lagerungsdauer abnimmt (RAMASAMY et al., 2000). Möglicherweise machen sich solche Effekte bei dem Trypsin/Chymotrypsin-behandelten Präparat A/A+ in stärkerem Maße bemerkbar, als bei den nicht modifizierten Präparaten H/H+ und M/M+.

Ein Einfluss der Nanofiltration auf die Fc-Bindung lässt sich nicht sicher ableiten. Zwar zeigten die drei nanofiltrierte Chargen des Präparates C+ mit durchschnittlich 89,9% Bindung gegenüber dem Vorgängerpräparat C (97,5%) eine statistisch signifikant niedrigere Fc-Bindung, jedoch konnte nur eine Charge des Präparates C (in dreifacher Wiederholung) getestet werden. Erschwerend für die Beurteilung kommt hinzu, dass das Präparat C in lyophilisierter Form hergestellt wurde, während später das Nachfolgepräparat C+ als Flüssigpräparat formuliert wurde.

Die zusätzliche Fettalkoholbehandlung bei Präparat E+ führte zu keiner veränderten Fc-Rezeptorbindung. Beide Präparate zeigten ein deutlich vermindertes, aber nahezu identisches Fc-Bindungsverhalten (E= 68,3%, E+= 68,4%).

5.4.2.2 Einfluss der Herstellungsverfahren

Auch im Fc-Rezeptor-Bindungstest zeigte sich der Einfluss der unterschiedlichen Herstellungsverfahren auf die Qualität der IVIG. Die Fc-Bindung war jedoch nur bei solchen Präparaten deutlich vermindert, bei denen das Herstellungsverfahren zu stark modifizierten, d.h. fragmentierten Antikörpermolekülen führt.

Die niedrigste Fc-Bindung wies das Pepsin-behandelte Präparat B (17,1%) auf, das durch die proteolytische Wirkung von Pepsin in F(ab)₂-Fragmente und Fc-Fragmente gespalten wurde.

Die zweitniedrigsten Werte ($E = 68,3\%$, $E+ = 68,4\%$) wurden bei dem Präparatepaar E/E+ gemessen. Im Gegensatz zu Präparat B erfolgt hier die Fragmentierung der Antikörper durch eine chemische Behandlung (S-Sulfitolyse) des Immunglobulins. Dabei werden die Disulfidbrücken zwischen den leichten und schweren Ketten des IgG-Moleküls gespalten. Die Reaktion findet jedoch nicht an allen vorhandenen Antikörpermolekülen in gleichem Umfang statt, so dass das Präparat, wie in der Diskussion der SDS-PAGE-Ergebnisse bereits beschrieben, aus verschieden großen Antikörperfragmenten zusammengesetzt ist, die sich aus den Kombinationsmöglichkeiten von H-Ketten und L-Ketten ergeben. Die Messwerte zeigten, dass noch ein bestimmter Anteil dieser Moleküle in der Lage war, an die Fc-Rezeptoren zu binden. Inwieweit an der Bindung nur vollständige, d.h. noch intakte Antikörper, oder aber auch Fragmente beteiligt sind, ist nicht bekannt. Festzuhalten bleibt, dass die S-Sulfitolyse zu einem IVIG-Präparat mit deutlich verminderter Fc-Funktion führt.

Nach GRONSKI (1982) handelt es sich bei der S-Sulfonierung jedoch um eine reversible chemische Modifizierung, die *in vivo* als auch unter bestimmten experimentellen Bedingungen wieder aufgehoben werden kann. So soll es im Organismus zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Molekülstruktur kommen, bei der gleichzeitig auch die Fc-Funktionen wiedererlangt werden können.

RAMASAMY et al. (2000) verglichen mit der gleichen Untersuchungsmethode das Fc-Bindungsverhalten von nativ belassenem IgG und einer daraus hergestellten IgG-Präparation, die reduziert und alkyliert wurde. Die Art der Modifizierung ist mit der des Präparates E/E+ vergleichbar und führte ebenfalls zu einer verminderten Fc-Bindung. RAMASAMY konnte zeigen, dass der Effekt vom Grad der Modifizierung abhängig war. Je höher die eingesetzte Menge des Reduktionsmittels DTT war, desto mehr verlor die Präparation die Fähigkeit an Fc-Rezeptoren zu binden.

Wie bereits erwähnt, zeigten nur die Präparate eine deutlich verminderte Fc-Bindung, deren Antikörpermoleküle durch die Herstellungsverfahren besonders stark fragmentiert wurden. Dagegen wurde die Fc-Rezeptorbindung durch Herstellungsverfahren, bei denen die Molekülstruktur erhalten bleibt, kaum beeinflusst. So hatte die β -Propiolacton-Behandlung bei Präparat C (97,5%) oder Präparat F (104,4%) keinen Einfluss auf die Fc-Bindung.

Bei den enzymatisch behandelten Präparaten bestimmen die verwendeten Enzyme und die Reaktionsbedingungen, wie Einwirkzeit, Temperatur, pH-Wert etc. den Grad der Modifizierung. Solange diese nicht zu einer Spaltung des Präparates führen, bleibt die Fc-Bindungsfähigkeit weitestgehend erhalten. Nur so lässt sich die wenig veränderte Fc-Bindung bei den Präparaten A/A+ (90,9% / 98,9%) und Präparat D (99,1%) erklären. Deren Fc-Bindung war mit denen nativer Präparate (92,3 bis 112,3%) unter Berücksichtigung der Variabilität solcher Testsysteme (durchschnittliche Standardabweichung 7,4%) durchaus vergleichbar.

5.4.2.3 Bemerkungen zur Methode

Ein kritischer Punkt der Methode ist, dass mit Zellkulturen gearbeitet werden muss. Wie die Versuche zur Stabilität der Fc-Rezeptor-Expression zeigten, kann der Anteil der Fc-Rezeptor tragenden Zellen von Tag zu Tag variieren. Um hier dennoch eine Standardisierung zu ermöglichen, wurde in jedem Testansatz eine Referenz-Antikörper-Präparation mitgeführt. Dieses Referenzmaterial wurde bereits für den Fc-Funktionstest als Standard mit normaler Fc-Funktion eingesetzt.

Für die vergleichende Untersuchung zweier Präparate war es aufgrund der gezeigten Variabilität der Fc-Rezeptor-Expression notwendig, die Proben parallel am gleichen Tag zu prüfen. Die Variabilität der Fc-Rezeptor-Expression auf Zellen ist bekannt und wird durch eine Reihe verschiedener biologischer Substanzen wie Hormone, Zytokine und Entzündungsmediatoren beeinflusst (SANCHEZ-MEJORADA, 1998). Die für die Zellkultur benötigten Serumzusätze, wie FKS, enthalten nicht definierte Mengen dieser Substanzen, deren Einfluss auf die Zellkultur nur schwer erfasst werden können bzw. kontrollierbar sind.

Eine Lösung bietet hier möglicherweise die Kultivierung der Zellen in serumfreien Kulturmedien. Als weitere Möglichkeit würde sich anbieten anstelle von Zellen Kunststoffkügelchen (Microbeads) zu verwenden, die mit Protein G beschichtet sind. Dieses Protein bindet humane Antikörper aller vier IgG-Subklassen in gleicher Weise über den Fc-Teil der Antikörper wie Fc-Rezeptoren. Damit wäre die umständliche Kultivierung der Zellen nicht notwendig und eine standardisierte Durchführung möglich.

5.4.2.4 Fc-Rezeptor-Bindungstest als Alternative zum Fc-Funktionstest?

Die Komplementaktivierung findet an der CH₂-Domäne des Fc-Teils eines Antikörpers statt (ABBAS, 1994). Diese Region wird auch für die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren verantwortlich gemacht. Dies wird durch Beobachtungen untermauert, dass mAk, die gegen das N-terminale Ende der CH₂-Domäne gerichtet sind, die Interaktion von IgG mit Fc-Rezeptoren hemmen (PARTRIDGE et al., 1986). Es stellte sich daher die Frage, inwieweit der Fc-Rezeptor-Bindungstest eine Alternative für den in der Monographie geforderten Fc-Funktionstest darstellen könnte. Daher wurde geprüft, inwieweit sich die verminderte Fc-Funktion bei chemisch oder enzymatisch modifizierten Präparaten in einer verminderten Fc-Rezeptorbindung widerspiegelt. Dazu wurden in Abbildung 38 die Ergebnisse des Fc-Funktionstests denen des Fc-Rezeptor-Bindungstests gegenübergestellt.

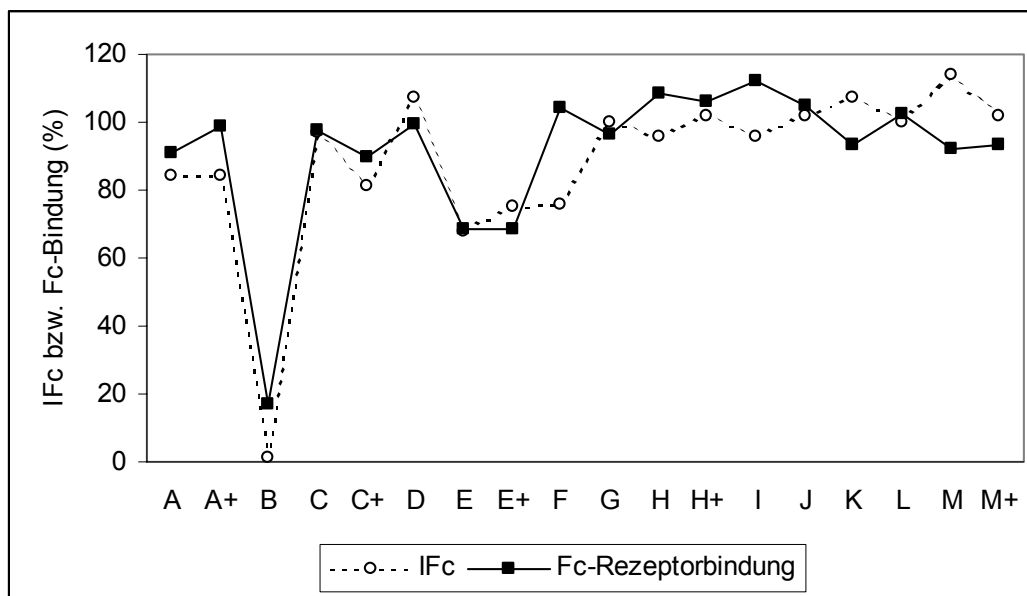


Abbildung 38 Gegenüberstellung der Ergebnisse des Fc-Funktionstests und des Fc-Rezeptorbindungstests. Als Bezugsgröße wurde in beiden Methoden die gleiche Referenzantikörper-Präparation (=100%) eingesetzt. Die Verbindungslinien dienen dem besseren optischen Vergleich der beiden Methoden.

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, liefern beide Methoden nicht bei allen Präparaten vergleichbare Ergebnisse. Für die voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich folgende Ursachen diskutieren:

1. Der für die Komplementaktivierung verantwortliche Molekülbereich eines Antikörpers unterscheidet sich von dem, der für die Fc-Rezeptorbindung verantwortlich ist.
2. Der Albuminanteil einiger Präparate beeinflusst die Ergebnisse der Fc-Rezeptorbindung. Es wurde beobachtet, dass höhere Fc-Bindungswerte bei Präparaten mit zunehmender Albuminkonzentration auftraten (Tabelle 49). Auf diesen Effekt von Albumin weist auch RAMASAMY (2000) hin.

Tabelle 49 Albumingehalt (Herstellerangaben) und Ergebnisse des Fc-Bindungstests verschiedener IVIG.

Präparat	Albumingehalt (mg/ml)	Fc-Bindung (%)
D	max. 3	99
H	3	108
H+	3	106
J	15	105
I	50	112

Beide Methoden zeigten bei Einsatz des Pepsin-behandelten Immunglobulins (Präparat B) deutlich reduzierte Werte (Fc-Funktionstest = 1%, Fc-Bindung = 17,1%). Während das Präparat nicht mehr imstande war, die komplementvermittelte Hämolyse zu induzieren, waren die Proben jedoch in der Lage – wenn auch deutlich vermindert – an die Fc-Rezeptoren zu binden. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da das Präparat nach Angaben der Fach- und Gebrauchsinformation aus F(ab)₂-Anteilen von Antikörpern bestehen soll. Dies erklärt einerseits zwar die fehlende Fc-Funktion, lässt andererseits aber die Frage aufkommen, woher die noch vorhandene schwache Fc-Bindung herrührt. Eine Antwort darauf war, dass das Präparat noch Fc-Fragmente oder intakte Antikörper enthält. Dies konnte durch Adsorption des Präparates an eine Protein-G-Säule bestätigt werden. Protein-G ist ähnlich wie Fc-Rezeptoren in der Lage Antikörper über den Fc-Teil zu binden. Das durch die Protein-G-Säule von den restlichen Fc-Fragmenten befreite Präparat zeigte noch eine Restbindung, die jedoch mit der von Albumin als Kontrolle identisch war. Dies zeigt, dass das Präparat Fc-Fragmente oder noch intakte Antikörper enthält. Für letzteres sprechen auch Untersuchungen von RÖMER et al. (1982), wonach ca. 11% der Präparation ein Molekulargewicht von intaktem IgG aufweist.

Das Präparat D soll nach LIEHL et al. (1980) durch milde Säurebehandlung, die durch chemisch-physikalische Verfahren ergänzt wird, so beschaffen sein, dass dessen Fc-Funktionen erhalten bleibt. Die Ergebnisse beider Methoden bestätigten diese Aussage (Fc-Bindung = 99,1%, Fc-Funktion = 107%).

Die S-Sulfonierung der Präparate E und E+ führte dagegen zu einer reduzierten Komplementaktivierung und verminderten Fc-Bindung. Wie bereits ausgeführt, führt die Sulfitolyse zu einem Produkt, das aus verschiedenen Kombinationen der H- und L-Ketten besteht. Ein gewisser Anteil von Antikörpern liegt im Präparat jedoch in intakter Form vor, der für die restliche Antikörperaktivität verantwortlich gemacht werden kann. Auch hier zeigten beide Methoden die Veränderungen an.

Eine größere Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Methoden wurde bei dem β -Propiolacton-behandelten Präparat F beobachtet. Während das Präparat eine reduzierte Komplementaktivierung (76%) aufwies, konnte eine reduzierte Fc-Rezeptorbindung (104,4%) nicht festgestellt werden. Der Fc-Bindungstest wird möglicherweise durch den hohen IgM-Gehalt (12%) des Präparates beeinflusst, da ein IgM-Molekül fünf Fc-Regionen besitzt, an die markierte Nachweis-Antikörper binden können.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass beide Methoden in der Lage sind, zumindest stark verminderte Fc-Funktionen von IVIG nachzuweisen. Welcher Methode der Vorzug gegeben werden soll, hängt auch von der Fragestellung ab, die geklärt werden soll. Soll die komplementaktivierende Eigenschaft eines Immunglobulins untersucht werden, oder dessen Fähigkeit an Fc-Rezeptoren zu binden? Beide Funktionen sind am Fc-Teil des IgG-Moleküls lokalisiert. Für die Komplementaktivierung ist eine vorherige Bindung an das Antigen nötig. Dagegen erfolgt die Fc-Bindung antigenunabhängig. Der Fc-Bindungstest besitzt aber den Nachteil, dass er bei albuminhaltigen Proben zu hohe Werte anzeigt.

Der Fc-Bindungstest beruht wahrscheinlich ausschließlich auf der Bindung eines bestimmten Molekülbereiches mit dem korrespondierenden Abschnitt der Fc-Rezeptoren. Dass die Bindung isolierter Fc-Fragmente an Fc-Rezeptoren möglich ist, belegen Untersuchungen mit isolierten Fc-Fragmenten, die in der Lage waren, die Rosettenbildung zu verhindern, die als Zeichen der Interaktion von Fc-Rezeptoren von Monozyten und antikörperbeschichteten Schafserthrozyten eintritt.

Inwieweit der eine oder andere Test eingesetzt wird, hängt auch von der Verfügbarkeit der technischen Mittel, besonders eines Durchflusszytometers ab. Zur Durchführung des Fc-Funktionstestes bedarf es andererseits größerer Mengen frischen Meerschweinchenkomplements. Die Haltung eigener Spendertiere bindet dabei Räumlichkeiten und Personal. So besitzen beide Methoden Vor- und Nachteile. Auch Parameter, wie die Präzision der Methoden, lassen keine besondere Bevorzugung für den einen oder anderen Test zu. Die Variabilität der beiden Methoden liegt in vergleichbarer Größenordnung. Der Variationskoeffizient des Fc-Funktionstestes liegt nach Literaturangabe zwischen 5-10% (KOTITSCHKE, 1993), der des Fc-Bindungstests nach eigenen Erfahrungen bei ca. 8%.

5.4.3 Phagozytostest

Der Phagozytostest wurde entwickelt, um die Eigenschaft der Immunglobuline zu prüfen, die Phagozytose von Bakterien durch Opsonisierung zu fördern. Diese Eigenschaft stellt eine der wichtigsten biologischen Funktionen von Antikörpern dar.

Die Untersuchungen sollten ursprünglich unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, da PILARS de PILAR (1989) bei Phagozytoseversuchen zur Prüfung von Immunglobulinen bemängelte, dass diese meist mit isolierten Phagozyten durchgeführt werden, statt sie „im physiologischen, aber hinderlichen Gewimmel der Erythrozyten zu belassen“.

Eine Reihe weiterer Gründe sprachen dafür mit Vollblut zu arbeiten:

Die Eigenschaften der Phagozyten sollten nach Möglichkeit nicht durch Isolierungsprozeduren beeinflusst werden, wie dies bei der Ficoll-Hypaque-Isolierung durch die Aufnahme von Zucker geschieht (WATSON, 1992). Darüber hinaus wird der Phagozytosevorgang durch andere Plasmaproteine, wie Entzündungsmediatoren, Komplementproteine, Lysozym, Fibronectin etc. beeinflusst, die in einem isolierten System nicht vorkommen (BIGLER, 1990; FRANK, 1991).

Die Vorversuche wurden daher mit frisch entnommenem venösen Blut durchgeführt, dem Immunglobuline in unterschiedlicher Konzentrationen und eine gleiche Menge bereits opsonisierter *E. coli* zugesetzt wurden. Es zeigte sich aber, dass der Zusatz von Immunglobulin keine wesentliche Steigerung der Phagozytose bedingte. Die Differenzen der Phagozytoserate mit und ohne Zusatz von IVIG waren zu gering, um verschiedene IVIG-Präparate vergleichen zu können. In den Vorversuchen zeigte sich auch, dass die Phagozytoseaktivität der Zellen verhindert wird, wenn die Präparate nicht vorverdünnt, d.h. in hoher Konzentration eingesetzt wurden. Dies wurde auch von NAZZARI et al. (1993) beschrieben.

Es wurde angenommen, dass das Serum der Blutspender ebenfalls Antikörper gegen *E. coli* enthält und eine weitere Zufuhr von Antikörpern zu keiner zusätzlichen Phagozytoseförderung führt. In diesem Fall müssten die spendereigenen Antikörper entfernt werden. Weiterhin wurde die Möglichkeit betrachtet, dass die *E. coli* bereits mit spezifischen Antikörpern gesättigt sind, da durch den Hersteller bereits eine Opsonisierung der Bakterien durch Inkubation mit gepoolten Sera stattfand. Dies konnte durch die Verwendung von optional erhältlichen, nicht opsonisierten *E. coli* ausgeschlossen werden. Die Verwendung nicht opsonisierter *E. coli* führte jedoch ebenfalls zu keinem deutlichen Unterschied zwischen Vollblut und IVIG-substituiertem Vollblut. Als weitere Ursache wurde vermutet, dass die Phagozytose dieses *E. coli*-Stammes antikörper-unabhängig stattfindet.

Die phagozytosefördernde Wirkung von IVIG ließ sich letztlich nur durch eine modifizierte Testdurchführung (Waschen der Zellen in PBS, Verwendung nicht opsonisierter *S. aureus*) nachweisen. Einzelheiten zur Testdurchführung sind ausführlich im Material- und Methodenteil (3.5.3., Seite 65) beschrieben.

5.4.3.1 Einfluss der Virusinaktivierung/Eliminierung

Das S/D-behandelte Nachfolgepräparat A+ zeigte gegenüber dem unbehandelten Präparat A eine um ca. 1-2 % erhöhte phagozytosefördernde Wirkung. Der Unterschied war in allen getesteten Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) signifikant. Die Ursache hierfür lässt sich jedoch nicht auf die S/D-Behandlung zurückführen, da andere S/D-behandelte Präparate diesen Einfluss ebenfalls erkennen lassen müssten. Es konnte aber kein Unterschied zwischen dem S/D-behandelten Präparat H+ und dem nicht behandelten Präparat H festgestellt werden. Auch zwischen Präparat M und dem S/D-behandelten Präparat M+ war kein signifikanter Unterschied vorhanden. Für die leicht erhöhte Phagozytoseaktivität des Präparates A+ ist möglicherweise das jüngere Herstellungsdatum der S/D-behandelten Chargen verantwortlich. Ein Hinweis darauf ergab sich bei der Addition der Subklassengehalte IgG1 bis IgG4. Das Präparat A enthielt durchschnittlich 51,6 mg/ml Gesamt-IgG, das Präparat A+ dagegen 55,7 mg/ml. Der niedrigere Proteingehalt bei Präparat A ist möglicherweise auf einen proteolytischen Abbau von IgG während der Lagerung zurückzuführen.

Bei dem β -Propiolacton-behandelten Präparatepaar C/C+ wurde nur in der Verdünnungsstufe 1:10 eine signifikante verminderte phagozytosefördernde Wirkung zugunsten des unbehandelten Vorgängerpräparates festgestellt. Bei den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:1000 waren die Unterschiede nicht mehr signifikant. Es muss hier aber auch berücksichtigt werden, dass nur eine Charge des Präparates C geprüft werden konnte. Diese Charge wurde wiederholt als Vergleichspräparat zu den anderen Chargen mitgetestet. Eine Aussage bezüglich des Einflusses der Nanofiltration lässt sich daher nicht ableiten.

Die Fettalkoholbehandlung bei dem S-sulfonylierten Präparat E+ führte in allen drei Verdünnungsstufen nicht zu einer signifikanten Änderung der phagozytosefördernden Wirkung des Präparates.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die phagozytosefördernde Wirkung der Präparate nicht durch die zusätzlichen Virusinaktivierungsverfahren beeinflusst wird.

5.4.3.2 Einfluss der Herstellungsverfahren

Modifizierte Immunglobuline besaßen gegenüber nicht modifizierten Präparaten eine deutlich verminderte phagozytosefördernde Wirkung. Einzige Ausnahme war das Pepsin- und pH4-behandelte Präparat D, das im Vergleich zu anderen modifizierten IVIG eine deutlich höhere Aktivität zeigte. Der Anteil phagozytischer Granulozyten betrug bei Präparat D 30,1% (1:10 verdünnt). Die Ergebnisse der anderen chemisch oder enzymatisch modifizierten Präparate betrugen im gleichen Experiment: A=15,9%, A+=15,6%, B=8,5%, C+=11,2%, E+=10,6% und F=14,7%. Der Vergleich zeigt, dass das Präparat D trotz der Pepsin- und pH4-Behandlung deutlich besser in der Lage war, die Phagozytose zu fördern. Innerhalb der kurzen Inkubationsdauer (10 min) wurde durch das Präparat D die doppelte Anzahl an Granulozyten aktiviert. Die spezielle Behandlung führt zu einem IVIG-Präparat, dessen opsonisierende Eigenschaften denen von nicht modifizierten IVIG-Präparaten entspricht. Das zeigte der Vergleich mit Phagozytoseraten der nicht modifizierten IVIG-Präparate aus dem gleichen Experiment: G=34,2%, H+=39,8%, I=26,6%, J=29,8% und L=30,9%.

Die niedrigste Wirkung wurde im Durchschnitt bei den mit β -Propiolacton-behandelten Präparaten C und C+, sowie bei dem IgM-haltigen Präparat F des gleichen Herstellers beobachtet. Die β -Propiolacton-Behandlung führt nach STEPHAN (1980) zur Einbindung von Hydroxypropionylgruppen in das Antikörpermolekül, wobei diese chemischen Gruppen gleichmäßig über das ganze Antikörpermolekül verteilt werden. Es kann angenommen werden, dass diese Behandlung für die verminderte phagozytosefördernde Wirkung verantwortlich ist. Auffallend ist jedoch, dass die Bindung an Fc-Rezeptoren dieser Präparate durch die β -Propiolacton-Behandlung nicht wesentlich beeinflusst wurde. Sie besaßen im Vergleich zu einem Referenzmaterial (=100%) folgende Fc-Bindungswerte: Präparat C=97,5%, C+= 89,9% und F=104,4%. Hier zeigt sich, dass zwischen Fc-Bindung und biologischer Wirkung eines Präparates kein Zusammenhang bestehen muss. Der Fc-Funktionstest zeigte dagegen die reduzierte Fc-Funktion an: C=97% (n=1), C+=81% (n=10) und F=76% (n=8).

Auch die sulfonierten Präparate E/E+ zeigten im Phagozytostest eine verminderte Wirkung (19,3% bzw. 14,2%). Als Ursache hierfür wird die S-Sulfitolyse gesehen, die zu einer Spaltung der Immunglobulinmoleküle führt. Eine extremere Form der Modifizierung erfolgt bei der Herstellung von Präparat B, das durch die Pepsin-Behandlung in $F(ab)_2$ -Fragmente gespalten wird. Entsprechend sollte das Präparat keine phagozytosefördernde Wirkung besitzen. Die Versuche zeigten aber, dass das Präparat B zumindest in der 1:10-Verdünnung in der Lage war, die Phagozytose in geringem Maß zu fördern (17,9%). Es wird angenommen, dass bei der gegebenen IVIG-Verdünnung eine Agglutination der Bakterien durch S.aureus-spezifische $F(ab)_2$ -Fragmente eintritt. Damit wird die Phagozytose der Bakterien durch die Granulozyten erleichtert. Eine Fc-Rezeptor vermittelte Aktivierung der Phagozyten tritt dagegen nicht ein.

Die Ergebnisse aus dem Phagozytostest lassen den Schluss zu, dass die zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungsschritte die phagozytosefördernde Wirkung der Präparate nicht beeinflussen. Da jedoch die meisten chemisch oder enzymatisch modifizierten Immunglobuline eine deutlich verminderte phagozytosefördernde Wirkung zeigten, lässt sich folgern, dass die Qualität der Immunglobulin-Präparate im wesentlichen durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird. Auch ALPERN et al. (1987) und VAN FURTH (1987) weisen in ihren Versuchen auf die Bedeutung der Herstellungsverfahren als Ursache für unterschiedliche Wirkung bei Immunglobulin-Präparaten hin.

5.4.3.3 Bemerkungen zur Methode

Der Phagozytostest reagierte im Vergleich zum Fc-Funktionstest und Fc-Rezeptor-Bindungstest am empfindlichsten auf chemisch oder enzymatisch modifizierte IVIG. Der Test erwies sich deshalb als geeignet die biologische Funktion von IVIG-Präparaten zu untersuchen.

Da beim Phagozytostest biologisches Material zum Einsatz kommt bzw. untersucht wird, muss mit einer gewissen Variabilität der Ergebnisse gerechnet werden. Wesentliche Faktoren die das Testergebnis beeinflussten waren: Spenderblut, Anzahl der Waschschrte, Verhältnis Bakterien zu Granulozyten, Inkubationstemperatur und -zeit. Vorversuche mit Blut des gleichen Spenders, an verschiedenen Tagen abgenommen, zeigten bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen, dass die Phagozytoserate von Tag zu Tag unterschiedlich ist. Daher sollten Proben, deren Aktivität verglichen werden soll, stets parallel im gleichen Testansatz untersucht werden. Bei der Blutentnahme ist darauf zu achten, dass nur Röhrchen mit Lithium-Heparin verwendet werden, da die Phagozytose durch Komplexbildner, wie EDTA, verhindert wird. Wichtig ist ebenfalls das Blut mit ausreichend PBS zu waschen, da spendereigene Antikörper das Ergebnis beeinflussen können. Das entnommene Blut sollte möglichst frisch verwendet werden, da Phagozyten empfindliche Zellen sind, die ihre Funktion bereits nach einigen Stunden verlieren. Bis zur Verwendung sollte das Blut als Vollblut bei Raumtemperatur gelagert und erst kurz vor dem Versuch mit PBS gewaschen werden. Eine Lagerung des entnommenen Blutes auf Eis ist nicht zu empfehlen, da Kälte zur Apoptose von Zellen führen kann.

Bei den Immunglobulinproben ist zu bedenken, dass einige Präparationen bei sauren pH-Werten (pH 4-4,25) endabgefüllt werden. Werden solche IVIG kaum oder nicht mit Puffer verdünnt, kann der unphysiologische pH-Wert das Testergebnis beeinflussen. Ein Faktor, der ebenfalls das Ergebnis beeinflussen könnte, ist der Antikörpergehalt der Präparate gegen *S. aureus*, sowie der Gesamt-IgG-Gehalt der IVIG-Präparate. Um Reproduzierbarkeit des Testsystems zu beurteilen, sollte eine Referenzantikörper-Präparation in jedem Test mitgeführt werden.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die bekannt gewordenen Übertragungen des Humanen Immunschwäche-Virus (HIV) und anderen pathogenen Viren durch Blutprodukte führten zur Entwicklung von Virusinaktivierungs- und Eliminierungsverfahren, die das Risiko einer Virusübertragung effektiv reduzieren. Für intravenöse Immunglobuline (IVIG), die aus Plasmen von mindestens 1000 Spendern hergestellt werden, werden solche Virusinaktivierungs- und Eliminierungsschritte zunehmend in den Herstellungsprozess integriert. Zur Inaktivierung/Eliminierung werden verschiedene Lösungsmittel/Detergenzien, chemische Reagenzien, Hitze und/oder spezielle Aufreinigungsverfahren angewandt. Dabei ist sicherzustellen, dass die Verfahren die Sicherheit der Präparate erhöhen, ohne deren Wirksamkeit zu beeinträchtigen.

Um den Einfluss der Verfahren zu bestimmen, wurden verschiedene Eigenschaften der IVIG, wie Proteinzusammensetzung, spezifische Antikörpergehalte und Antikörperfunktion vor und nach Einführung der Virusinaktivierungs-/Eliminierungsschritte untersucht.

Es wurde festgestellt, dass die zusätzlich eingeführten Virusinaktivierungs-/Eliminierungsschritte die Eigenschaften der Präparate nicht verändern. Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass IVIG keine einheitlichen Produkte darstellen. Es wurden Unterschiede in der Proteinkomposition, der IgG-Subklassen-Zusammensetzung, dem Antikörpergehalt und den Antikörperfunktionen (Komplementaktivierung, Fc-Rezeptorbindung, Phagozytoseförderung) festgestellt. Die Unterschiede zeigten sich besonders beim Vergleich nativ belassener und chemisch oder enzymatisch behandelter Immunglobulin-Präparate.

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ließen sich, in Abhängigkeit der bei der Herstellung verwendeten Enzyme und Reaktionsbedingungen, einige IVIG bereits an den erhaltenen Proteinbandenmustern identifizieren. Weniger deutlich war dies bei den chemisch modifizierten IVIG zu erkennen. Ausgenommen davon war ein sulfoniertes Präparat, das in der nativen SDS-PAGE ein deutliches Fragmentierungsmuster aufwies.

Für die unterschiedliche IgG-Subklassen-Zusammensetzung der Präparate sind einerseits die Herstellungsverfahren, andererseits aber auch Molekülmodifizierungen verantwortlich, da sie die Bestimmung der Subklassen erschweren.

Die Messung verschiedener Antikörperspezifitäten (Parvovirus B19, Hepatitis A Virus, Cytomegalovirus, Varizella Zoster Virus, Hepatitis B Oberflächenantigen, Röteln, Staphylolysin, Streptolysin) zeigte, dass native Immunglobulin-Präparate in der Regel höhere Antikörperaktivitäten besitzen als chemisch oder enzymatisch behandelte Präparate. Auch hier wurde deutlich, dass die Modifizierung einiger Präparate zu Schwierigkeiten bei der Wertbestimmung führen kann. Dies ist besonders dann der Fall, wenn das Testsystem die Antikörper über die Bindung eines markierten Sekundärantikörpers nachweist.

Die wichtigsten funktionellen Eigenschaften der Immunglobulin-Präparate (Komplementaktivierung, Fc-Rezeptorbindung, Phagozytoseförderung) wurden vergleichend untersucht. Es wurde festgestellt, dass die modifizierten Präparate im Durchschnitt das Komplementsystem weniger stark aktivieren konnten. Ausnahme war ein Pepsin- und pH4-behandeltes Präparat (D), das eine normale Fc-Aktivität aufwies. Die nativen Präparate besaßen im Vergleich zum Referenzmaterial eine normale Fc-Funktion.

Zur weiteren Funktionsprüfung der Immunglobuline wurden ein Fc-Rezeptor-Bindungstest und ein Phagozytostest als neue Testmethoden entwickelt. Mit dem Fc-Rezeptor-Bindungstest wurde die Fähigkeit der Immunglobuline untersucht, an Fc-Rezeptoren einer Zelllinie (THP-1) zu binden. Der Test war in der Lage Unterschiede zwischen stark modifizierten Fc-Teilen und funktionell intakten Fc-Teilen zu erkennen. Der Vergleich mit dem Fc-Funktionstest der Monographie zeigte aber, dass moderate Veränderungen der Fc-Funktion nicht eindeutig erfasst werden konnten. Den Vorteilen des Fc-Rezeptor-Bindungstestes (Antigenunabhängigkeit, Prüfung aller Antikörperspezifitäten, Kontrollierbarkeit der Reagenzien, Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit von Blutspendern und die Möglichkeit der Prüfung von monoklonalen Antikörpern) stehen geringe Empfindlichkeit und Abhängigkeit vom Albumingehalt der Proben gegenüber.

Als ein weiterer funktioneller Parameter wurde die phagozytosefördernde Wirkung der Immunglobulin-Präparate untersucht. Als Maß für deren Wirkung wurde der prozentuale Anteil phagozytischer Granulozyten durchflusszytometrisch bestimmt, die fluoreszenzmarkierte *S. aureus* Bakterien aufnahmen. Die Virusinaktivierungsverfahren besaßen keinen Einfluss auf die phagozytosefördernden Eigenschaften der IVIG. Auch hier zeigte sich der Einfluss der unterschiedlichen Herstellungsverfahren. Die niedrigsten Phagozytoseraten wurden wiederum bei den chemisch oder enzymatisch modifizierten Immunglobulinen beobachtet. Die einzige Ausnahme bildete auch hier das Pepsin- und pH 4-behandelte Präparat. Die nicht modifizierten Immunglobuline bewirkten in der gleichen Inkubationszeit (10 min) die Aktivierung der etwa doppelten Anzahl von Granulozyten.

Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Eigenschaften intravenöser Immunglobuline nach der Einführung zusätzlicher Virusinaktivierungs-/Eliminierungsschritte erhalten bleiben. Somit stehen mit den Nachfolgepräparaten IVIG zur Verfügung, die neben den Eigenschaften der Vorgängerpräparate auch eine hohe Virussicherheit aufweisen. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass Immunglobulin-Präparate keine einheitliche Gruppe von Präparaten darstellen. Die Präparate besitzen individuelle Eigenschaften, die im wesentlichen durch die unterschiedlichen Herstellungsverfahren bestimmt werden. Immunglobulin-Präparate stellen daher keine beliebig austauschbaren Arzneimittel dar.

Zwischen modifizierten und nativen Präparaten waren die deutlichsten Unterschiede festzustellen. Daher sollten bei der Auswahl eines Immunglobulin-Präparates die veränderten Eigenschaften der modifizierten Immunglobuline berücksichtigt werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn klinische Daten erhoben werden. Es ist vorstellbar, dass die zum Teil unterschiedlichen klinischen Erfolge bei der Anwendung von IVIG mit den unterschiedlichen Eigenschaften der Präparate in Verbindung gebracht werden können. Es wäre daher empfehlenswert, in der Gebrauchsinformation auf die spezifischen Herstellungsverfahren, insbesondere auf die Art der Modifizierung hinzuweisen.

Darüber hinaus sollte in die Monographie eine Auswahl klinisch relevanter Antikörperspezifitäten aufgenommen werden, deren Gehalt deklariert werden sollte.

Die Monographie enthält zur funktionellen Prüfung der Immunglobuline lediglich einen Fc-Funktionstest. Andere funktionelle Prüfungen, wie die Opsonisierungsfähigkeit der Immunglobuline werden nicht gefordert. Der vorgestellte Phagozytostest erwies sich als geeignete Methode und sollte daher in die Prüfung von Immunglobulin-Präparaten aufgenommen werden.

Abschließend sei bemerkt, dass einige Immunglobulin-Präparate bereits anhand ihrer Protein-Bandenmuster identifiziert werden konnten. Die SDS-PAGE ist daher als Identitätstest geeignet und ermöglicht darüber hinaus die Kontrolle einer gleichbleibenden Herstellungsweise der Präparate. Damit empfiehlt es sich, diese Methode dauerhaft als Prüfmethode einzusetzen.

7 Summary and Conclusions

The knowledge of the transmission of human immunodeficiency virus (HIV) and other pathogenic viruses by blood products led to the development of viral inactivation and elimination procedures, which effectively reduced the risk of viral transmission. For intravenous immunoglobulins (IVIG) made of plasma pools derived from at least 1000 donors viral inactivation and elimination steps were introduced to the production process. Viral inactivation/elimination procedures are based on different solvents/detergents, chemical agents, heat and/or special purification procedures. It has to be ensured that the procedures increase the safety of the preparations without any impairment of activity.

To determine the influence of the procedures on IVIG, different properties such as composition of protein, content of specific antibodies and antibody functions were investigated before and after introduction of viral inactivation/elimination procedures.

It was observed that introduction of additional viral inactivation/elimination steps did not alter the properties of the IVIG preparations. The investigations also demonstrate that IVIG are not a homogeneous group of preparations. Differences in composition of protein, IgG-subclass composition, antibody content and antibody functions (activation of complement, Fc receptor binding, enhancement of phagocytosis) were determined. Differences were revealed especially by comparison between native and chemically or enzymatic treated immunoglobulin preparations.

Identification of some IVIG was achieved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) due to their protein pattern, depending on enzymes and reaction conditions used in the course of production. This was less clear with chemically modified IVIG, with the exception of a sulfonated preparation which clearly showed a pattern of fragmentation by native SDS-PAGE. Differences in IgG-subclass composition of preparations are due to production process on the one hand, and to modifications of molecules on the other hand, as they complicate the determination of subclasses.

Determination of different specific antibodies (parvovirus B19, hepatitis A virus, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, hepatitis B surface antigen, rubella, staphylolysin, streptolysin) showed that native immunoglobulin preparations in contrast to chemically or enzymatic treated preparations possess higher antibody activities. Also in this case it was obvious that modification of preparations complicated the determination. Especially in cases where the assay detects the antibodies by binding of a labeled secondary antibody.

The most important functional properties of immunoglobulin preparations (activation of complement, Fc receptor binding, enhancement of phagocytosis) were compared. It was found that modified preparations on average showed a reduced ability to activate the complement system, with the exception of a pepsin- and pH 4-treated preparation, which had a normal Fc activity. In comparison to the reference material, untreated preparations showed a normal Fc function.

For further testing of antibody functions a Fc receptor binding assay and a phagocytosis assay were developed as two new methods. With Fc receptor binding assay the ability of immunoglobulins to bind to Fc receptors of a cell line (THP-1) was investigated. The assay was able to detect differences between strongly modified Fc-parts and functionally intact Fc-parts. Comparison with the Fc-function-assay of the monograph, however, showed that moderate alterations of Fc-function could not be registered clearly. The advantages of the Fc receptor binding assay (independence of antigen, testing of all antibody species, controlling of reagents, independence of availability of blood donors and the possibility to test monoclonal antibodies) should be weighed against the low sensitivity and dependency on albumin content of probes.

As a further functional parameter the phagocytosis enhancing effect of immunoglobulin preparations was investigated. To this end the percentages of phagocytosing granulocytes ingesting fluorescence labeled *S. aureus* bacteria were determined by flow cytometry. Viral inactivation procedures had no influence on the phagocytosis enhancing properties of IVIG. Yet again in this case the influence of manufacturing procedure was shown.

The lowest rates of phagocytosis were observed in chemically or enzymatic modified immunoglobulins, with the exception of the pepsin- and pH 4-treated preparation. The non-modified immunoglobulins led to activation of about double amount of granulocytes within a similar incubation time (10 min).

Conclusions

The investigations have shown that the properties of intravenous immunoglobulins remain unchanged after the introduction of additional viral inactivation/elimination steps. Thus, with the follow-up preparations, IVIG are available which share properties of the preceding preparations but also have high viral safety. In addition the results proved that immunoglobulin preparations do not present a homogeneous group of drugs. The preparations possess individual properties essentially defined by different manufacturing processes. Therefore immunoglobulin preparations do not present interchangeable drugs. The most significant differences were found between modified and native preparations. Thus for selection of a immunoglobulin preparation the altered properties of modified immunoglobulins have to be considered. This is valid especially for the acquisition of clinical data. It is conceivable that the differences in clinical success of IVIG could be connected with the different properties of the preparations. Therefore, it is recommended to point out specific manufacturing procedures in the instructions for use especially concerning the type of modification made. In addition a selection of clinically relevant antibody specificities should be registered in the monograph, including a declaration of their content. For the functional test of immunoglobulins, the monograph only mentions an Fc function assay. Other functional assays like opsonisation ability of immunoglobulins were not requested. The presented phagocytosis assay was an appropriate method and therefore should be added to the testing of immunoglobulin preparations.

Finally, it should be noted that some immunoglobulin preparations were identified by their SDS-PAGE protein pattern. Accordingly, SDS-PAGE is suitable as an identity assay and furthermore enables the controlling of a constant manufacturing process of preparations. Thus, it is recommended to apply this method as a test method on a permanent basis.

8 Literaturverzeichnis

- 1 **ABBAS, A.K. (1994):**
Cellular and molecular immunology, 2nd Edition
Eds. Abbas, Lichtman, Pober
W.B. Saunders Company, Pennsylvania, pp. 70-92
- 2 **ALLEN, L.-A. H., ADEREM, A. (1996):**
Mechanisms of phagocytosis.
Current Opinion in Immunologie 8 (1): 36-40
- 3 **ALPERN, M., GARCIACELAY, Z., HOOPER, J. (1987):**
Opsonophagocytic activity of intravenous immunoglobulins.
Lancet 2: 97
- 4 **ANDERSON, L.J., TSOU, C., PARKER, R.A., CHORBA, T.L., WULFF, H.,
TATTERSALL, P., MORTIMER, P.P. (1986):**
Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked
immunosorbent assay.
Journal of Clinical Microbiology 24 (4): 522-526
- 5 **Antibodies: A Laboratory Manual (1988):**
Eds. Ed Harlow, David Lane
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 6 **BARRETT, P.N., MEYER, H., WACHTEL, I., EIBL, J., DORNER, F. (1996)**
Determination of the inactivation kinetics of hepatitis A virus in human plasma
products using a simple TCID50 assay.
Journal of Medical Virology 49 (1):1-6
- 7 **BECK, C.S., HEINER, D.C. (1981):**
Selective immunoglobulin G4 deficiency and recurrent infections of the
respiratory tract.
The American Review of Respiratory Disease 124 (1): 94-96
- 8 **BENDER, S., HETHERINGTON, S. (1987):**
Haemophilus influenzae type b opsonins of intravenous immunoglobulins.
Journal of Clinical Immunology 7 (6): 475-480
- 9 **BERGER, A. et al. (1997):**
Follow-up of four HIV-infected individuals after administration of hepatitis C
virus and GBV-C/hepatitis G virus contaminated intravenous immunoglobulin:
evidence for HCV but not for GBV-C/HGV transmission.
Journal of Medical Virology 53 (1): 25-30

- 10 **BIGLER, R.D., KHOO, M., LUND-KATZ, S., SCERBO, L., ESFAHANI, M. (1990):**
Identification of low density lipoprotein as a regulator of Fc receptor-mediated phagocytosis.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87 (13): 4981-4985
- 11 **Biotest-Broschüre**
Information zum Thema:
Wirkungsverlust von Immunglobulinen durch enzymatischen Abbau.
- 12 **BJØRO, K. et al. (1994):**
Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinaemia after treatment with contaminated immune globulin.
The New England Journal of Medicine 331 (24): 1607-1611
- 13 **BLÜMEL, J., SCHMIDT, I., WILLKOMMEN, H., LÖWER, J. (2002):**
Inactivation of parvovirus B19 during pastuerization of human serum albumin.
Transfusion 42 : 1011-1018
- 14 **BONGERS, J. et al. (2000):**
Validation of a peptide mapping method for a therapeutic monoclonal antibody: what could we possibly learn about a method we have run 100 times?
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 6: 1099-1128
- 15 **BOSHKOV, L.K., KELTON, J.G. (1989):**
Use of intravenous gammaglobulin as an immune replacement and an immune suppressant.
Transfusion Medicine Reviews 3 (2): 82-120
- 16 **BOTTIGER, M. et al. (1997):**
Hepatitis A immunity in the Swedish population. A study of the prevalence of markers in the Swedish population.
Scandinavian Journal of Infectious Diseases 29 (2): 99-102
- 17 **BOWDEN, R.A. et al. (1991):**
Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant.
Blood 78: 246
- 18 **BRESEE, J.S. et al. (1996):**
Hepatitis C virus infection associated with administration of intravenous immune globulin. A cohort study.
The Journal of the American Medical Association 276 (19):1563-1567

- 19 **BROWN, A.M. et al. (1984):**
Detection of IgG-associated determinants in reduced and alkylated preparations of human IgG3 by monoclonal antibodies.
Vox Sanguinis 47: 412-420
- 20 **BROWN, K.E., YOUNG, N.S., LIU, J.M. (1994):**
Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection.
Critical Reviews in Oncology/Hematology 16 (1): 1-31
- 21 **BUSSEL, J.B. (2000):**
Fc receptor blockade and immune thrombocytopenic purpura.
Seminars in Hematology 37 (3): 261-266
- 22 **CATHOU, R.E. et al. (1976):**
Solution conformation and segmental flexibility of immunoglobulins.
In Litman G.W., Good R.A.: Immunoglobulins, New York: Plenum, pp. 37-83
- 23 **CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1981):**
Pneumocystis pneumonia-Los Angeles.
Morbidity and Mortality Weekly Report 30: 250
- 24 **CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1994):**
Outbreak of hepatitis C associated with intravenous immunoglobulin administration-United States.
Morbidity and Mortality Weekly Report 43: 505-509
- 25 **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1994):**
Addressing emerging infectious disease threats:
A prevention strategy for the United States Atlanta, Georgia. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- 26 **CHEHIMI, J., PEPPARD, J., EMANUEL, D. (1987):**
Selection of an intravenous immune globulin for the immunoprophylaxis of cytomegalovirus infections: an in vitro comparison of currently available and previously effective immune globulins.
Bone Marrow Transplantation 2: 395-402
- 27 **COHEN, B.J., BUCKLEY, M.M. (1988):**
The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales.
Journal of Medical Microbiology 25 (2) :151-153
- 28 **COHN, E.J., STRONG, L.E., HUGHES, J.R. et al. (1946):**
Preparation and properties of serum and plasma proteins IV.
A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.
Journal of the American Chemical Society 68: 459-475

- 29 **COLVIN, B.T., RIZZA, C.R., HILL, F.G.H. et al. (1988):**
Effect of dry-heating of coagulation factor concentrates at +80 °C for 72 hours on transmission of non-A non-B hepatitis.
Lancet 2: 814-816
- 30 **Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (1998):**
Position statement on new variant CJD and plasma derived medical products.
CPMP/201/98, 25. Feb 1998
- 31 **Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (2000):**
Core SPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg).
CPMP/BPWG/859/95 rev.1, 29. Jun 2000
- 32 **COUROUCE, A.M., FERCHAL, F., MORINET, F., MULLER, A., DROUET, J., SOULIER, J.P., PEROL, Y. (1984):**
Human parvovirus infections in France.
Lancet 1: 160
- 33 **Deutsches Arzneibuch (DAB 10) (1994):**
Monographie: Immunglobulin vom Menschen zur intravenösen Anwendung
10. Ausgabe 1994. 3. Nachtrag 1994
Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
- 34 **DIXON. M., WEBB, E.C. (1964):**
Heat inactivation of enzymes.
In: Enzymes. Academic Press, pp. 145-150
- 35 **DOCKRELL, D.H., POLAND, G.A., JONES, M.F., SMITH, T.F. (1996):**
Variability in parvovirus B19 IgG levels in intravenous immunoglobulin samples.
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 26 (3-4): 133-135
- 36 **DOLHÖFER-BLIESENER, R., GERBITZ K.D. (1990):**
Impairment by glycation of immunoglobulin G Fc fragment function.
Scandinavian Journal of Laboratory Investigation 50: 739-746
- 37 **ENDERS, G., GEURSEN, R.G. (1982):**
Zur Prophylaxe von Diphtherie, Röteln und Varizellen mit homologen Immunglobulinen.
Die gelben Hefte XXII (1982)
- 38 **FACKRELL, H.B., AUSTIN, J.W., SIMPSON, D.A. (1985):**
Initial characterization of the interaction of staphylococcal alpha-toxin with its receptor on erythrocyte membranes.
The Staphylococci, Zentralblatt für Bakteriologie Supplemente 14: 287-293
- 39 **FEINSTEIN, A., ROWE, A. (1965):**
Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex.
Nature (London) 205: 147-149

- 40 **FERGUSON, M. (1995):**
Anti-Parvovirus B19 serum: Report of a collaborative study.
WHO Expert Committee on Biological Standardisation BS/95.1810: 1-20
- 41 **FERNANDES P.M., LUNDBLAD, J.L. (1980):**
Preparation of a stable intravenous gamma-globulin: process design and scale-up.
Vox Sanguinis 39 (2): 101-112
- 42 **FINLAYSON, J.S. (1979):**
Therapeutic plasma fractions and plasma fractionation (Prologue).
Seminars in Thrombosis and Hemostasis VI: pp. 1-11
- 43 **FRANK, M.M., FRIES, L.F. (1991):**
The role of complement in inflammation and phagocytosis.
Immunology Today 12 (9): 322-326
- 44 **FUNAKOSHI, S., UEMURA, Y., YAMAMOTO, N. (1988):**
Virus inactivation and elimination by liquid heat treatment and PEG fractionation
in the manufacture of immune globulin intravenous.
In: Immunoglobulins.
Eds.: HW Krijnen, PFW Strengers, WG van Aken, Central Laboratory of the
Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, pp. 313-325
- 45 **GERETY, R.J., SMALLWOOD, L.A., FINLAYSON, J.S., TABOR, E. (1983):**
Standardization of the antibody to hepatitis A virus (anti-HAV) content of
immunoglobulin.
Developments in Biological Standardization 54: 411-416
- 46 **GERRITZEN, A., SCHNEWEIS, K.E., BRACKMANN, H-H. et al. (1992):**
Acute Hepatitis A in haemophiliacs.
Lancet 340: 1231-1232
- 47 **GOMPERTS, E.D. (1996):**
Gammagard and reported hepatitis C virus episodes.
Clinical Therapeutics 18 (Suppl B): 3-8
- 48 **GRONSKI, P. (1982):**
Die S-Sulfonierung: Eine reversible chemische Modifizierung von
Immunglobulinen
Die gelben Hefte 1/1982, XXII: 40-45
- 49 **GRONSKI, P. et al. (1983):**
S-sulfonation: a reversible chemical modification of human immunoglobulins
permitting intravenous application.
I. Physicochemical and binding properties of S-sulfonated and reconstituted IgG.
Vox Sanguinis 45(2): 144-154

- 50 **HAGENBEEK, A., BRUMMELHUIS, G.J., DONKERS, A. et al. (1987):**
Rapid clearance of cytomegalovirus-specific IgG after repeated intravenous infusions of human immunoglobulin into allogeneic bone marrow transplant recipients.
The Journal of Infectious Diseases 155: 897-902
- 51 **HAUPT, H. (1990):**
Bedeutung der Human-Plasmaproteine.
Plasma Proteins, Blood Coagulation, Antibodies, Immune Diagnostic,
Behring Institute Mitteilungen Nr. 86, Oktober 1990,
Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg, S. 1-66
- 52 **HEINER, D.C. (1986):**
IgG Subclass composition of intravenous immunoglobulin preparations: clinical relevance.
Reviews of Infectious Diseases 8 (Suppl 4): 391-395
- 53 **HENSON, P.M., SPIEGELBERG, H.L. (1973):**
Release of serotonin in human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses.
The Journal of Clinical Investigation 52: 1282
- 54 **HIRSCH, M.S., CURRAN, J. (1996):**
Human immunodeficiency viruses.
In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al., Eds, Fields Virology,
Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1953-1975
- 55 **HOLLINGER, F.B., DOLANA, G., THOMAS, W., GYORKY, F. (1984):**
Reduction in risk of hepatitis transmission by heat treatment of a human Factor VIII concentrat.
The Journal of Infectious Diseases 150: 250-262
- 56 **HOOPER, J.A., ALPERN, M., MANKARIOUS, S. (1988):**
Immunoglobulin manufacturing procedures.
In: Immunoglobulins. Eds.: HW Krijnen, PFW Strengers, WG van Aken, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, pp. 361-380
- 57 **HOROWITZ, B., WIEBE, M.E., LIPPIN, A., STRYKER, M.H. (1985):**
Inactivation of viruses in labile blood derivatives I:
Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations.
Transfusion 25: 516-522

- 58 **HOROWITZ, B. (1988):**
Preparation of virus sterilized immune globuline solutions by treatment with organic solvent/detergent mixtures.
In: Immunoglobulins. Eds.: HW Krijnen, PFW Strengers, WG van Aken, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, pp. 285-295
- 59 **HOROWITZ, B., PRINCE, A.M., HOROWITZ, M.S., WATKLEVICZ, C. (1993):**
Viral safety of solvent-detergent treated blood products.
Developments in Biological Standardization 81: 147-161
- 60 **HOROWITZ, B., PRINCE, A.M., HAMMAN, J., WATKLEVICZ, C. (1994):**
Viral Safety of solvent/detergent blood products.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 5 (Suppl 3): 21-28
- 61 **HUNGERER, K.-D., RONNEBERGER, H. (1990):**
In vitro- und In vivo-Wirksamkeit eines Toxin neutralisierenden humanen Staphylokokken-Immunglobulins.
Behring Institute Mitteilungen Nr.86 Oktober 1990
Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, Marburg, S. 170-184
- 62 **Intravenous Immunoglobulins in Clinical Practice (1997):**
Eds. Martin L. Lee and Vibeke Strand
Marcel Dekker Inc., New York
- 63 **JACOB, B., NATVIG, ØYSTEIN FØRRE (1986):**
The Initial Recognition of IgG Subclasses.
In: Basic and Clinical Aspects of IgG Subclasses
Kager Monogr. Allergy, Karger, Basel Vol. 19: pp. 1-6
- 64 **JANEWAY, C.A., MERLER, E., ROSEN, F.S. et al. (1968):**
Intravenous gamma globulin. Metabolism of gamma globulin fragments in normal and agammaglobulinemic persons.
The New England Journal of Medicine 278: 919-23
- 65 **JANEWAY, C.A., TRAVERS, P. (1995):**
Die humorale Immunantwort.
In: Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 331-389
- 66 **KEMPF, C., JENTSCH, P., POIRIER, B. et al. (1991):**
Virus inactivation during production of intravenous immunoglobulin.
Transfusion 31: 423-427

- 67 **KISTLER, P., NITSCHMANN, H. (1962):**
Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier.
Vox Sanguinis 7: 414-424
- 68 **KOTITSCHKE, R. (1993):**
Assessment of the Fc function in human immunoglobulins for intravenous administration. Multicenter study of the section 'Blood plasma Constituents' of the German Association for Transfusion Medicine and Immunohematology (DGTI).
Infusionstherapie und Transfusionsmedizin 3: 93-95
- 69 **KURTZMAN, G. et al. (1989):**
Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent Parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy.
The New England Journal of Medicine 321 (8): 519-523
- 70 **LANE, R.S. (1983):**
Non-A, non-B hepatitis from intravenous gammaglobulin.
Lancet 2: 974-975
- 71 **LEIBY, D.A. (1996):**
Emerging transfusion-transmitted infectious agents: Is there a threat?
Symposium: The Safety of the nation's blood supply.
American Society of Hematology, Orlando, December 6
- 72 **LEIBY, D.A., KERR, K.L., CAMPOS, J.M., DODD, R.Y. (1997):**
A retrospective analysis of microbial contaminants in outdated random-donor platelets from multiple sites.
Transfusion 37 (3): 259-263
- 73 **LEIJH, P.C.J., VAN FURTH, R. and VAN ZWET, T.L. (1986):**
In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes.
In: Handbook of Experimental Immunology: 2 Cellular Immunology,
Eds.: Weir, D.M., Herzenberg, L.A., Blackwell, C., Herzenberg, L.A.
Blackwell Scientific Publications Chapter 46, pp. 1-18
- 74 **Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten (1995):**
Herausgegeben vom Vorstand und Wissenschaftlichen Beirat der
Bundesärztekammer, 1. Auflage
Deutscher Ärzteverlag, Köln
- 75 **LEVER, A.M.L., WEBSTER, A.D.B., BROWN, D., THOMAS, H.C. (1984):**
Non-A, non-B hepatitis occurring in agammaglobulinaemic patients after intravenous immunoglobulin.
Lancet 2: 1062-1064

- 76 **Lexikon der Immunologie (1992)**
Bundschuh, Schneeweiß, Bräuer, Hans, 2. Auflage
Medical Service München
- 77 **LIEHL, E., ARMERDING, D., BÖCKMANN, J. (1980)**
Effektorfunktionen und protektive Wirkung von Standardimmunglobulin und Immunglobulin nach modifizierter milder Säurebehandlung.
Infection 8 (5): 194-198
- 78 **LINDE, G.A. et al. (1983):**
Virus-specific antibody activity of different subclasses of immunoglobulin G and A in cytomegalovirus infections.
Infection and Immunity 42: 237-244
- 79 **LINDE, G.A. (1985):**
Subclass distribution of rubella-specific immunoglobulin G.
Journal of Clinical Microbiology 21: 117-121
- 80 **LOUIE, R.E., GALLOWAY, C.J., DUMAS, M.L. et al. (1994):**
Inactivation of hepatitis C Virus in low pH intravenous immunoglobulin.
Biologicals 22: 13-19
- 81 **LUNDBLAD, J.L., SENG, R.L. (1991):**
Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate.
Vox Sanguinis 60: 75-81
- 82 **MANCINI, G., CARBONARA, A. O. et al. (1965):**
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2: 235-254
- 83 **MANUCCI, P.M. (1992):**
Outbreak of hepatitis A among italian patients with hemophilia.
Lancet 339: 819
- 84 **MASUHO, Y., TOMIBE, K., MATSUZAWA, K., OHTSU, A. (1977):**
Development of an intravenous gammaglobulin with Fc activities
I: Preparation and characteristics of S-sulfonated human gamma-globulin.
Vox Sanguinis 32: 175-181
- 85 **MC CUE, J.P., HEIN, R.H., TENOLD, R. (1986):**
Three generations of immunoglobulin G preparations for clinical use.
Review Infectious Disease 8 (Suppl 4): 374-381
- 86 **MITRA, G., WONG, M.F., MOZEN, M.M. et al. (1986):**
Elimination of infectious retroviruses during preparation of immunoglobulin.
Transfusion 26: 394-397

- 87 **MORELL, A. et al. (1983):**
Immunglobulin G subclass restriction of antibodies against hepatitis B surface antigen.
Infection and Immunity 39: 565-568
- 88 **MORELL, A. (1986):**
Various immunoglobulin preparations for intravenous use.
Vox Sanguinis 51 (Suppl 2): 44-49
- 89 **MORELL, A. (1994):**
Clinical relevance of IgG subclass deficiencies.
Annales de biologie clinique (Paris) 52 (1): 49-52
- 90 **MORFINI, S., AZZI, A., MANUCCI, P.M. (1996):**
B 19 Parvovirus withstands "Super Heating" in antihemophilic concentrates.
Thrombosis and Haemostasis 76 (5): 821
- 91 **MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A. (1987):**
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction.
Methods in Enzymology 155: 335-350
- 92 **NACHBAUR, M. et al. (1997):**
A comparative study of the in vitro immunomodulatory activity of human intact immunoglobulin (7S IVIG), F(ab')₂ fragments (5S IVIG) and Fc fragments.
Evidence for post-transcriptional IL-2 modulation.
Immunology 90: 212-218
- 93 **NAGENDRA, K.A. et al. (1998):**
Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIG) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: A novel mechanism of action of IVIG involving the Fas apoptotic pathway.
The Journal of Immunology 161: 3781-3790
- 94 **NAZZARI, C. et al. (1993):**
Effect of intravenous immunoglobulin on opsonic activity and TNF production in patients at high risk for sepsis syndrome.
Microbiologica 16: 251-258
- 95 **NOELKEN et al. (1965):**
Cross conformation of rabbit 7S immunoglobulin and its papain-cleaved fragments.
Journal of Biological Chemistry 240: 218-224
- 96 **NORDENFELT, E. (1992):**
Hepatitis A in Swedish travellers.
Vaccine 10 (Suppl 1): 73-74

- 97 **NOWAK, T., GREGERSON, J.-P., KLOCKMANN, U. et al. (1992):**
Virus safety of human immunoglobulins: efficient inactivation of hepatitis C and other human pathogenic viruses by the manufacturing procedure.
Journal of Medical Virology 36: 209-216
- 98 **OCHS, H.D., WEDGWOOD, R.J. (1987):**
IgG subclass deficiencies.
Annual Review of Medicine 38: 325-340
- 99 **ONCLEY, J.L., MELIN, M., RICHERT, D.A. et al. (1949):**
The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and β 1-lipoprotein into subfractions of human plasma.
Journal of the American Chemical Society 71: 541-550
- 100 **PARTRIDGE, L.J., WOOF, J.M., JEFFERIS, R., BURTON, D.R. (1986):**
The use of anti-IgG monoclonal antibodies in mapping the monocyte receptor site on IgG.
Molecular Immunology 23 (12): 1365-1372
- 101 **PENNEL, R.B. (1957):**
The distribution of certain viruses in the fractionation of plasma.
In: Hepatitis Frontiers
Eds.: F.W. Hartman, G.A. LoGrippe, J.G. Mateer, J. Barron, Little Brown, Boston, pp. 297-310
- 102 **PILARS DE PILAR, C. E., RUILE, H., KÖNIG, E. (1989):**
Aviditätsprüfung intravenös anwendbarer Immunglobulinpräparate.
Intensivmedizin und Notfallmedizin 26 (Suppl 1): 90-96
- 103 **PISZKIEWICZ, D., ANDREWS, J., HOLST, S. et al. (1986):**
Safety of immunoglobulin preparations containing antibody to LAV/HTLV-III.
In: Progress in Immunodeficiency Research and Therapy II.
Eds.: J. Vossen and C. Griscelli,
Elsevier, Amsterdam, pp. 197-200
- 104 **POLLACK, M. (1983):**
Antibody activity against *Pseudomonas aeruginosa* in immune globulins prepared for intravenous use in humans.
The Journal of Infectious Diseases 147: 1090-1098
- 105 **PRINCE, A.M., STEPHAN, W., BROTMAN, B. (1983):**
 β -propiolactone/ultraviolet irradiation:
A review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives.
Review Infectious Disease 5 (1): 92-107

- 106 **PRINCE, A.M., HOROWITZ, B., DICHTELMÜLLER, H. et al. (1985):**
Quantitative assays for evaluation of HTLV-III inactivation procedures:
Tri(N-butyl)phosphate, sodium cholate and β -propiolactone.
Cancer Research 45: 4592-4594
- 107 **RAMASAMY, I., TRAN, E., CHARNOCK, A., FARRUGIA, A. (2000):**
Flow-Cytometric method for the quantitation of the Fc function of intravenous immunoglobulin preparations.
Vox Sanguinis 78: 185-193
- 108 **REAGAN, W.J. et al. (1998):**
Effects of human intravenous immunoglobulin on canine monocytes and lymphocytes.
American Journal of Veterinary Research 59 (12): 1568-1574
- 109 **REED, K.G., CUTHBERTSON, B., JONES, A.D.L., MCINTOSH, R.V. (1988):**
Potential contribution of mild pepsin treatment at pH 4 to the viral safety of human immunoglobulin products.
Vox Sanguinis 55: 75-80
- 110 **ROBERTSON, B.H., ERDMAN, D.D. (2000)**
Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products.
Developments in Biological Standardization 102: 29-35
- 111 **ROITT, I.M. (1988):**
Molecules which recognize antigen.
In: Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, 6th Ed., pp. 31-44
- 112 **RÖMER, J., MORGENTHALER, J.J., SCHERZ, R. et al. (1982):**
Characterization of various immunoglobulin-preparations for intravenous application. I. Protein composition and antibody content.
Vox Sanguinis 42: 62-73
- 113 **RÖMER, J., SPÄTH, P.J., SKVARIL, F. et al. (1982):**
Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application. II. Complement activation and binding to Staphylococcus protein A.
Vox Sanguinis 42: 74-80
- 114 **SALDANHA, J., MINOR, P. (1996):**
Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implications for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture.
British Journal of Haematology 93 (3): 714-719
- 115 **SAMUELSSON, A., TOWERS, T.L., RAVETCH, J.V. (2001):**
Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor.
Science 291: 484-486

- 116 **SANCHEZ-MEJORADA, G., ROSALES, C. (1998):**
Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors.
Journal of Leukocyte Biology 63 (5): 521-533
- 117 **SCHIFF, P., SUTHERLAND, S.K., LANE, W.R. (1968):**
The preparation, testing and properties of human γ -globulin for intravenous administration.
Australian Paediatric Journal 4: 121-126
- 118 **SCHUR, P.H., BOREL, H., GELFAND E.W., ALPER, C.A., ROSEN, F.S. (1970):**
Selective gamma-g globulin deficiencies in patients with recurrent pyogenic infections.
The New England Journal of Medicine 283 (12): 631-634
- 119 **SCHWARZ, T.F., ROGGENDORF, M., DEINHARDT, F. (1987):**
Incidence of parvovirus B19 infection. Seroepidemiologic studies.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 112 (40): 1526-1531
- 120 **SCHWARZ, T.F., JAGER, G., SCHLIPKOTER, U.A., WIERSBITZKY, S., TILLER, F.W., HOTTENTRAGER, B., DEINHARDT, F., ROGGENDORF, M. (1990):**
Parvovirus B19 infections in Germany 1987-1988.
Das Öffentliche Gesundheitswesen 52 (2): 53-57
- 121 **SCOTT-MONCRIEFF, J.C.R. et al. (1995):**
Treatment of nonregenerative anemia with human gamma-globulin in dogs.
Journal of the American Veterinary Medical Association 206: 1895-1900
- 122 **SCOTT-MONCRIEFF, J.C.R. et al. (1997):**
Intravenous administration of human immune globulin in dogs with immune-mediated hemolytic anaemia.
Journal of the American Veterinary Medical Association 210: 1623-1627
- 123 **SEILER, F.R. (1982):**
Antikörper: Struktur, Funktion und medizinische Bedeutung.
Die Medizinische Verlagsgesellschaft Umwelt & Medizin mbH
Die gelben Hefte XXII, 1-13
- 124 **SGOURIS, J. T. (1967):**
The preparation of plasmin-treated immune serum globulin for intravenous use.
Vox Sanguinis 13: 71-84
- 125 **SKVARIL, F. (1986):**
Subclass composition of intravenous IgG preparations in basic and clinical aspects of IgG subclasses.
In: Monographs in Allergy Vol. 19,
Eds: Shakib, F., Derby, Karger, Basel, pp. 266-276

- 126 **SPIEGELBERG, H.L., FISHKIN, B.G. (1972):**
The catabolism of human G immunoglobulins of different heavy chain subclasses.
3. The catabolism of heavy chain disease proteins and of Fc fragments of myeloma proteins.
Clinical and Experimental Immunology 10 (4): 599-607
- 127 **STEPHAN, W. (1975):**
Undegraded human immunoglobulin for intravenous use.
Vox Sanguinis 28: 422-437
- 128 **STEPHAN, W., FASOLD, H. (1980):**
Intravenöses Human-Immunglobulin durch chemische Modifizierung mit β -Propiolacton.
Arzneimittel-Forschung/Drug Research 30 (II) 12, 2090-2093
- 129 **STEPHAN, W., DICHTELMÜLLER, H., PRINCE, A.M., BROTMAN, B., HUIMA, T. (1988):**
Inactivation of the Hutchinson strain of hepatitis non-A, non-B virus in intravenous immunoglobulin by β -propiolactone.
Journal of Medical Virology 26: 227-232
- 130 **SUNDQVIST, V.A. et al. (1984):**
Virus-specific immunoglobulin G subclasses in herpes simplex and varicella zoster virus infections.
Journal of Clinical Microbiology 20: 94-98
- 131 **SUNDSTROM, C., NILSSON, K. (1976):**
Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).
International Journal of Cancer 17 (5): 565-577
- 132 **SUOMELA, H. (1993):**
Inactivation of viruses in blood and plasma products.
Transfusion Medicine Reviews 7 (1): 42-57
- 133 **TABOR, E., GERETY, R. (1979):**
Transmission of hepatitis B by immune serum globulin.
Lancet 2: 1293
- 134 **TEELING, J.L. et al. (2001):**
Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia.
Blood 98 (4):1095-1099
- 135 **TEMPERLY, I.J., COTTER, K.P., WALSH, T.J. et al. (1992):**
Clotting factors and hepatitis A.
Lancet 340: 1466

- 136 **TONEGAWA, S. (1983):**
Somatic generation of antibody diversity.
Nature 302: 575-581
- 137 **TSUCHIYA, S. et al. (1980):**
Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).
International Journal of Cancer 26: 171-176
- 138 **TYLER, K.L., FIELDS, B.N. (1996):**
Pathogenesis of Viral Infection.
In: BN Fields, DM Knipe, PM Howley et al., Eds, Fields Virology, Lippinkott-Raven, Philadelphia, pp. 173-218
- 139 **UEMURA, Y., YANG, Y.H.J., HELDEBRANT, C.M. et al. (1994):**
Inactivation and elimination of viruses during preparation of human intravenous immunoglobulin.
Vox Sanguinis 67: 246-254
- 140 **VAN FURTH, R., BRAAT, A.G.P., LEIJH, P.C.J., GARDI, A. (1987):**
Opsonic and physicochemical characteristics of intravenous immunoglobulin preparations.
Vox Sanguinis 53: 70-75
- 141 **WATSON, F., ROBINSON, J., EDWARDS, S.W. (1992):**
Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines.
Bioscience Reports 12 (2): 123-133
- 142 **WINSTON, D.J., HO, W.G., RASMUSSEN, L.E. et al. (1982):**
Use of intravenous immune globulin in patients receiving bone marrow transplants.
Journal of Clinical Immunology 2 (April Suppl): 42-47
- 143 **WRIGHT, A.E. and DOUGLAS, S.R. (1904):**
An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis.
Proceedings: The Royal Society London 72: 357
- 144 **ZIEGLER-HEITBROCK et al. (1988):**
Establishment of a human cell line (MonoMac 6) with characteristics of mature monocytes.
International Journal of Cancer 41 (3): 456-461
- 145 **YAP, P.L. (1996):**
The viral safety of intravenous immune globulin.
Clinical and Experimental Immunology 104 (Suppl 1): 35-42

9 Anhang

Präparat A (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
243 089 404	26	19,4	2,4	2,6	7,2	4,0	600	608	107	92	25,15
243 219 410	49	11,7	6,6	5,6	11,4	5,3	600	1216	77	n.d.	21,56
243 1696 G	38	7,3	5,6	6,8	17,6	4,0	600	608	108	n.d.	21,17
243 1796 G	41	6,0	9,0	5,7	5,3	5,3	800	1216	105	93	17,08
243 1896 H	38	10,0	6,0	7,1	17,3	5,3	800	608	103	n.d.	11,42
243 1996 C	48	9,0	3,1	6,8	18,1	4,0	800	608	55	n.d.	6,71
243 0296 A	46	7,2	22,7	6,0	8,9	5,3	800	1216	73	n.d.	13,60
243 0895 G	35	20,5	2,0	3,5	4,8	4,0	600	608	63	n.d.	n.d.
243 0597 E	34	12,5	8,2	4,7	7,5	5,3	600	608	61	89	15,86
245 3097 F	37	24,0	5,2	4,4	8,5	4,0	600	608	87	n.d.	13,79

Präparat A+ (Charge)	Anti- PV B19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
247 069 7G	50	7,1	5,2	6,4	15,3	n.d.	n.d.	2432	102	102	28,40
247 059 7G	48	5,7	4,8	6,5	16,2	n.d.	n.d.	608	80	n.d.	17,93
247 019 7G	33	4,3	5,8	4,5	19,0	n.d.	n.d.	608	99	n.d.	25,74
247 039 7GB	48	8,1	6,2	7,8	13,6	n.d.	n.d.	1216	101	n.d.	12,93
247 029 7G	29	4,7	6,0	5,4	20,4	n.d.	n.d.	1216	109	n.d.	25,87
247 049 7GA	49	9,0	7,6	5,5	19,7	n.d.	n.d.	1216	81	101	15,61
247 079 7G	38	4,7	15,8	6,0	16,6	n.d.	n.d.	1216	70	n.d.	19,01
247 089 7G	38	4,5	16,0	5,5	11,1	n.d.	n.d.	1216	73	n.d.	6,45
247 049 7GB	51	10,8	5,0	6,8	21,3	n.d.	n.d.	1216	68	n.d.	12,86
247 049 7GD	46	10,6	5,6	6,8	18,7	n.d.	n.d.	1216	55	93	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat B (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
163 021	-	12,0	12,2	0,2	0,2	5,3	1200	608	0	14	21,80
164 021	-	14,0	10,0	0,2	0,1	8,0	1200	608	1	n.d.	19,13
164 011	-	24,0	10,6	0,2	0,1	5,3	900	608	2	n.d.	32,10
166 021	-	12,0	67,0	0,2	0,1	8,0	900	608	3	n.d.	n.d.
165 011	-	15,0	62,0	0,2	0,0	8,0	1200	608	6	n.d.	16,58
136 021	-	30,5	9,6	0,2	0,1	5,3	1200	608	1	3	15,97
131 021	-	33,0	7,8	0,2	0,0	8,0	1200	608	-8	n.d.	10,13
128 021	-	25,8	8,8	0,3	0,1	5,3	1200	608	1	n.d.	8,52
112 011	-	26,5	18,8	0,3	0,2	8,0	1200	608	1	n.d.	19,78
117 021	-	56,8	11,6	0,3	0,4	5,3	900	608	4	35	17,29

- = nicht bestimmbar

Bei Anti-CMV und Anti-VZV lagen die Werte unter der Nachweisgrenze der Testmethode

Präparat C (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
140 1073	35, 37 2 x Wdh.	19,8	1,8	4,5 ± 1,6 11 x Wdh	16,5 ± 3,7 10 x Wdh.	2,7	600	524	97	91,95,106 3 x Wdh.	12,63 ± 5,27 8 x Wdh.

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat C+ (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
141 085	26	46,0	6,4	3,3	6,4	2,0	600	639*	97	97	8,04
141 195	29	35,5	8,5	3,1	5,8	2,0	600	598*	89	82	5,40
141 225	29	36,5	7,0	2,7	7,2	3,0	400	578*	99	n.d.	16,02
141 424	27	27,1	5,6	2,7	3,4	2,7	400	608	103	n.d.	n.d.
141 336	34	32,8	12,2	3,2	5,9	2,7	400	608	66	n.d.	4,60
141 346	28	29,3	11,9	3,1	5,6	2,7	600	608	47	n.d.	3,45
141 455	32	29,5	11,3	4,1	10,2	2,7	600	608	94	n.d.	15,94
141 425	30	30,5	7,0	3,0	5,2	2,7	600	608	69	n.d.	6,40
141 435	26	44,8	7,6	3,0	5,6	2,7	400	608	66	n.d.	14,02
141 445	28	27,5	12,2	3,2	9,5	4,0	300	608	80	88	11,16

* = Daten aus Methodenvalidierung

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat D (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
5301 (3%)	106,7	35,0	10,3	4,7	18,5	2,7 (3%)	750 (3%)	304 (3%)	108	101	n.d.
4310 (3%)	95,0	40,0	7,0	3,8	25,0	2,7 (3%)	500 (3%)	588 (3%)*	108	n.d.	n.d.
5401 (6%)	160,0	28,3	11,3	4,8	11,5	5,3 (6%)	900 (6%)	608 (6%)	99	n.d.	n.d.
6203 (3%)	140,0	35,8	10,3	5,7	14,1	2,7 (3%)	300 (3%)	304 (3%)	111	n.d.	n.d.
6410 (6%)	171,7	23,3	11,7	5,5	20,3	5,3 (6%)	900 (6%)	1155 (6%)*	96	n.d.	n.d.
6407 (6%)	101,7	35,4	8,3	4,0	10,3	2,7 (6%)	900 (6%)	608 (6%)	108	103	n.d.
6408 (6%)	116,7	33,3	6,3	4,5	14,0	5,3 (6%)	600 (6%)	608 (6%)	91	n.d.	n.d.
6308 (3%)	101,7	17,5	8,5	4,8	21,2	2,7 (3%)	450 (3%)	578 (3%)*	83	n.d.	n.d.
6409 (6%)	100,8	19,2	9,5	5,3	18,2	5,3 (6%)	600 (6%)	608 (6%)	106	n.d.	30,11
6309 (3%)	118,3	20,8	9,2	5,0	17,0	2,7 (3%)	500 (3%)	304 (3%)	164	93	n.d.

Die angegebenen Werte wurden auf eine 5%ige Lösung umgerechnet oder die Proben wurden für die Bestimmung auf 5%ige Lösung eingestellt. Wurden die Proben in ihrer ursprünglicher Konzentration bestimmt, ist die Konzentration in Klammern angegeben.

* = Daten aus Methodenvalidierung

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat E (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
421265021	52	19,5	1,0	3,4	11,2	2,7	600	304	43	71	29,59
315 021	49	11,0	0,4	3,4	13,5	2,7	600	304	84	n.d.	17,04
337 021	52	9,8	1,0	3,0	7,8	2,7	300	304	64	n.d.	19,65
273 021	48	15,5	1,2	3,3	5,3	2,7	300	304	69	n.d.	n.d.
278 011	51	23,8	1,0	3,9	13,8	2,7	225	608	76	68	27,12
301 011	62	10,5	0,8	3,2	10,1	2,7	225	304	83	66	n.d.
304 011	63	33,5	0,8	3,4	15,9	2,7	450	304	57	n.d.	17,78
324 021	53	21,3	0,9	3,7	10,8	2,7	450	304	66	n.d.	13,70
327 021	47	13,8	0,8	3,1	9,2	2,7	300	304	61	n.d.	17,49
332 021	55	23,5	0,4	3,6	9,9	2,7	400	304	77	n.d.	11,82

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat E+ (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
029 021	51	10,0	1,2	4,5	5,0	4,0	225	608	94	72	16,81
031 011	67	8,5	1,0	4,3	6,6	2,7	300	304	104	n.d.	13,69
028 021	51	9,0	2,8	3,0	11,0	2,7	300	304	69	n.d.	14,47
032 021	70	10,0	0,8	3,4	3,5	2,7	225	304	64	68	n.d.
030 011	56	7,0	1,8	4,5	6,9	4,0	450	608	76	n.d.	18,71
032 011	77	17,5	1,0	2,7	5,5	2,7	300	608	53	n.d.	9,37
024 011	56	16,0	1,2	2,9	9,7	2,7	450	304	n.d.	n.d.	14,01
027 011	64	20,0	1,8	4,0	10,2	2,7	450	304	n.d.	n.d.	16,36
020 021	54	22,3	1,2	2,9	10,4	2,7	450	304	62	65	10,56
018 011	50	12,0	1,0	4,5	9,7	2,7	300	304	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat F (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
146 025	58	22,5	189,5	4,3	28,6	4,0	400	304	61	98	n.d.
146 175	67	27,0	173,9	2,9	13,3	4,0	600	304	100	n.d.	n.d.
146 124	62	32,5	16,4	5,6	66,5	2,7	600	304	90	n.d.	n.d.
146 296	52	15,0	19,8	4,0	26,4	4,0	600	304	108	n.d.	n.d.
146 336	53	29,5	18,2	3,4	7,0	4,0	600	304	n.d.	n.d.	n.d.
146 227	63	9,1	468,7	12,6	38,4	4,0	800	n.d.	64	n.d.	14,66
146 275	74	37,5	508,9	5,7	37,7	2,7	600	304	60	n.d.	n.d.
146 256	50	19,9	179,7	3,4	19,2	2,7	400	304	63	117	n.d.
146 376	41	37,5	21,6	3,5	6,7	4,0	1200	304	64	98	n.d.
146 047	53	16,5	n.d.	4,1	71,9	4,0	600	304	n.d.	n.d.	n.d.
146 346	52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat G (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
162 0501	175	32,0	17,0	11,8	43,7	5,3	600	608	93	94	49,56
261 9201	152	26,0	48,2	11,9	39,8	4,0	600	1216	101	n.d.	38,74
262 0501	183	31,0	18,8	10,9	56,3	5,3	600	608	113	n.d.	48,45
262 4101	150	23,0	12,2	11,4	21,7	5,3	800	608	126	n.d.	17,56
361 9301	153	21,0	55,0	11,9	40,8	4,0	450	608	111	n.d.	42,57
362 0601	150	22,0	14,2	11,5	34,8	5,3	600	608	85	n.d.	43,34
420 801	190	40,8	7,0	9,2	35,3	5,3	400	608	58	n.d.	28,61
427 901	117	61,5	4,9	8,9	25,6	4,0	800	304	100	103	n.d.
433 401	96	77,0	6,1	10,3	43,8	4,0	1200	608	105	n.d.	n.d.
435 601	99	66,9	7,8	7,0	42,6	4,0	600	608	97	n.d.	n.d.
500 401	161	50,5	7,0	8,2	49,2	4,0	1200	608	112	91	34,15
509 601	146	39,9	7,6	12,5	35,5	4,0	1200	608	98	n.d.	35,64

Präparat H (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
93 J 03 AB 11	164	39,1	7,8	9,8	27,0	4,0	800	419,2*	103	112	41,94
93 I 12 AB 11	185	26,4	14,5	10,3	33,3	4,0	800	419,2*	102	104	29,47
94 A 11 AB 11	247	24,4	14,5	8,7	37,2	4,0	800	419,2*	99	n.d.	46,10
93 K 08 A B11	249	31,9	15,3	7,4	21,0	4,0	800	419,2*	128	n.d.	17,62
93 K 07AB11D	244	26,1	19,2	8,7	43,1	4,0	800	419,2*	97	109	41,59
93 F 21 AB 11	261	26,7	8,8	9,7	29,7	2,0	800	419,2*	61	n.d.	36,39
93 K 04 A B11	244	28,2	8,8	8,9	43,0	3,0	800	419,2*	84	n.d.	36,14/52,80

* = Bestimmt mit Anti-Röteln-Standard, dessen Aktivität 13,1 IU/ml statt 19,0 IU/ml betrug

Präparat H+ (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
95 D24 AB 11	289	29,0	12,9	9,2	25,2	4,0	600	1216	93	109	47,54
95 E 03 AB 11	266	24,0	14,2	9,1	26,8	4,0	800	1216	112	n.d.	n.d.
94 I 19 AB 12	143	43,0	12,5	7,3	43,9	4,0	600	608	108	n.d.	51,84
95 B 07 AB 11	305	13,0	16,6	9,4	11,9	4,0	800	1216	115	n.d.	n.d.
96 I 23 AB 11	307	20,0	22,7	17,3	80,4	5,3	800	1216	121	n.d.	31,88
94 J 24 AB 11	294	25,0	9,9	7,5	20,2	4,0	600	1216	59	n.d.	16,02
94 C 15 AB 12	216	52,8	11,3	6,4	45,9	4,0	800	1216	92	n.d.	30,69
96 K 06 AB 11	309	31,0	18,1	10,0	30,1	4,0	900	1216	96	n.d.	40,84
96 G 05 AB 11	366	30,50	10,6	8,8	30,5	4,0	800	1216	116	105	39,77
96 K 06 AB 12	341	28,80	14,1	9,5	31,1	4,0	900	1216	107	105	44,81

Präparat I (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
659 50 A 51	263	7,7	2,4	6,0	29,7	4,0	600	1216	87	95	n.d.
628 21 C 51	215	4,7	1,9	6,4	27,8	4,0	800	1216	108	103	n.d.
832 41 A 52	248	7,5	1,9	5,9	29,8	4,0	800	1216	112	n.d.	n.d.
689 12 B 01	212	6,0	2,8	6,8	14,8	4,0	600	1216	122	n.d.	n.d.
730 68 A 01	201	6,0	2,1	6,3	26,7	4,0	1200	1216	92	n.d.	n.d.
679 77 A 52	207	6,7	2,9	6,6	27,0	4,0	450	1216	n.d.	n.d.	n.d.
644 31 A 52	124	6,8	1,8	6,3	22,0	4,0	450	1216	78	n.d.	n.d.
730 68 A 52	183	6,7	1,7	6,6	21,2	4,0	600	1216	89	139	n.d.
737 78 A 52	188	7,0	1,6	5,9	23,8	5,3	900	1216	96	n.d.	n.d.
828 96 A 01	179	6,8	1,6	6,4	22,0	4,0	600	1216	84	n.d.	26,60

n.d. = nicht durchgeführt

Präparat J (Charge)	Anti-PVB19 (IU/ml)	Anti-HAV (IU/ml)	Anti-HBsAg (IU/g Ig)	Anti-VZV (IU/ml)	Anti-CMV (PEI E/ml)	Anti-Staphylolysin (IU/ml)	Anti-Streptolysin (IU/ml)	Anti-Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc-Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
150 037	81	13,0	8,6	8,6	20,4	5,3	1200	419,2*	100	101	45,31
150 047	80	17,0	11,6	10,1	29,8	4,0	1200	419,2*	99	n.d.	36,40
150 067	67	18,0	24,6	5,5	40,8	4,0	1200	209,6*	105	96	53,03
150 077	83	14,0	12,5	7,5	16,8	4,0	1200	209,6*	101	n.d.	n.d.
150 127	78	16,0	8,4	5,4	22,6	8,0	1200	209,6*	104	n.d.	35,75
150 137	72	17,0	5,9	6,0	27,3	5,3	1200	209,6*	88	116	n.d.
150 147	78	17,0	14,9	6,0	24,3	4,0	800	209,6*	104	n.d.	35,75
150 157	62	18,0	15,2	7,4	25,3	4,0	800	209,6*	101	n.d.	36,31
150 177	78	20,0	7,0	8,0	26,3	4,0	1200	209,6*	107	n.d.	29,77
150 187	74	15,0	19,8	7,8	19,9	4,0	800	209,6*	110	n.d.	48,82

* = Bestimmt mit Anti-Röteln-Standard, dessen Aktivität 13,1 IU/ml statt 19,0 IU/ml betrug

Präparat K (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
151 017	83	39,1	32,4	4,5	7,2	n.d.	600	n.d.	109	90	n.d.
199 165	77	33,8	22,4	5,5	11,0	n.d.	n.d.	n.d.	104	89	n.d.

n.d.= nicht durchgeführt

Präparat L (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylolysin (IU/ml)	Anti- Streptolysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
637 073 8400	189	32,3	20,6	9,2	33,2	4,0	800	608	104	99	44,32
638 074 8400	190	33,3	13,8	8,7	37,1	4,0	800	608	99	94	36,50
640 076 8400	250	35,0	16,8	7,9	39,5	4,0	900	304	102	n.d.	n.d.
549 065 840	221	44,0	15,2	4,7	12,5	4,0	600	608	102	n.d.	46,85
537 037 840	200	49,0	8,8	7,8	26,8	4,0	800	608	107	n.d.	34,80
511 008 840	192	24,5	8,4	7,6	31,0	3,0	600	608	78	n.d.	33,35
604 008 840	151	36,0	22,0	4,4	11,7	2,0	600	608	99	n.d.	29,46
705 007 8400	193	32,0	12,4	12,4	25,8	3,0	800	608	94	n.d.	30,91
705 006 8400	238	39,0	10,4	12,2	26,0	4,0	1200	608	104	n.d.	41,13
713 023 8400	239	57,5	13,6	5,9	17,4	4,0	600	608	112	114	n.d.

n.d.= nicht durchgeführt

Präparat M (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylo- lysin (IU/ml)	Anti- Strepto- lysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
AEVB 1	191	40,5	10,4	8,0	24,1	4,0	450	608	115	96	45,25
DABEN 1	215	46,0	23,4	9,2	(166,5)	2,7	450	608	110	n.d.	40,84
ADWU 1	214	50,0	31,4	8,9	(164,7)	2,7	300	608	99	n.d.	43,47
DAAHV 1	148	53,5	16,8	8,0	15,4	4,0	400	608	105	n.d.	37,59
AEFX 1	233	38,0	15,4	9,0	30,2	4,0	300	1216	120	n.d.	27,69
DACUJ 1	200	17,0	20,0	6,7	28,0	4,0	1200	608	119	90	n.d.
DACVC 1	151	22,0	17,2	9,5	30,4	4,0	600	608	113	n.d.	n.d.
DACUK 1	165	34,0	25,2	8,0	25,4	4,0	400	608	135	91	16,02
DAACW 1	159	21,0	12,8	6,5	22,4	4,0	300	608	107	n.d.	32,22
DACLU 1	177	24,0	12,0	8,1	31,2	4,0	600	n.d.	n.d.	n.d.	42,95

()=Aus Plasmen hergestellt, die ebenfalls zur Herstellung spezifischer Anti-CMV-Immunglobuline verwendet wurden

n.d.= nicht durchgeführt

Präparat M+ (Charge)	Anti- PVB19 (IU/ml)	Anti- HAV (IU/ml)	Anti- HBsAg (IU/g Ig)	Anti- VZV (IU/ml)	Anti- CMV (PEI E/ml)	Anti- Staphylo- lysin (IU/ml)	Anti- Strepto- lysin (IU/ml)	Anti- Röteln (IU/ml)	IF _c (%)	Fc- Bindung (%AUC)	Phagozytose 1:10 (%)
X 646R003 B	272	21,5	6,0	9,2	32,7	4,0	1200	608	116	102	70,03
X 646R003 C	249	31,0	7,6	9,7	32,5	4,0	800	608	89	n.d.	38,78
X 646R001	233	26,0	12,3	9,5	39,5	4,0	1200	608	98	n.d.	n.d.
X 646P005	181	32,5	11,6	8,6	18,5	4,0	600	608	96	90	n.d.
DADWU 1	289	47,0	10,8	7,6	32,2	4,0	600	608	119	n.d.	50,67
DADWT 1	204	37,0	10,0	11,1	22,5	4,0	600	608	90	n.d.	47,56
DAEH 1	188	32,5	21,2	9,7	37,5	4,0	600	608	93	n.d.	28,90
DADZB 1	235	34,5	20,8	8,8	30,9	4,0	800	608	98	n.d.	17,19
DADZD 1	227	35,5	19,6	9,2	41,7	4,0	600	608	101	n.d.	45,59
DADZE 1	207	38,5	22,2	10,2	36,0	4,0	600	608	111	89	n.d.
DAEAN 1	201	36,0	18,8	9,1	36,2	4,0	600	608	104	n.d.	n.d.
DADZA 1	227	44,3	18,8	8,7	n.d.	4,0	800	608	104	n.d.	28,72

n.d. = nicht durchgeführt

IgG-Subklassenbestimmung: Messwerte der untersuchten Chargen

RID-Platte 1

Präparat	Charge	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
H	93 F 21 AB 11	28,5	11,7	3,4	0,3
H	93 K 07 AB 11D	28,5	11,1	3,8	0,2
H+	95 B 07 AB 11	32,2	10,4	3,3	0,2
H+	96 K 06 AB 12	34,7	10,4	4,3	0,3
I	628 21C51	27,3	14,5	2,4	0,2
I	659 50 A51	26,2	14,5	3,1	0,3
M	AEFX 1	32,2	15,2	3,7	0,7
M	DACUK 1	37,3	13,8	3,6	0,8
M+	DADZB 1	37,3	11,7	3,6	0,6
M+	DAEH1	30,9	11,7	3,6	0,7

RID-Platte 2

Präparat	Charge	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
K	151 017	27,1	19,7	1,1	1,4
K	199 165	28,3	19,0	2,0	1,4
C+	141 346	32,1	22,9	0,0	1,6
C+	141 455	32,1	19,7	0,0	1,6
F	146 124	34,7	8,4	3,7	2,2
F	146 296	34,7	11,3	2,9	3,0
E	273 021	22,5	12,6	1,1	1,6
E	315 021	25,9	14,0	0,7	2,2
E+	018 011	27,1	14,6	0,2	2,2
E+	028 021	27,1	14,0	1,1	2,0

RID-Platte 3

Präparat	Charge	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
G	162 0501	38,9	11,6	0,2	0,5
G	427 901	36,1	12,9	1,2	0,9
B	166 021	0,0	0,0	5,0	0,0
B	165 011	0,0	0,0	5,2	0,0
J	150 037	17,6	10,4	3,1	0,8
J	150 047	29,4	10,4	3,1	0,6
L	537 037 840	32,0	9,2	3,1	0,6
L	549 065 840	25,7	12,9	2,4	0,7
D	5401	29,4	15,6	3,3	1,5
D	6409	32,0	16,3	3,4	1,6

RID-Platte 4

Präparat	Charge	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
A+	247 049 7 GA	35,7	19,3	0,0	0,7
A+	247 049 7 GD	34,3	17,1	0,2	0,8
A+	247 069 7 G	38,6	20,0	0,0	0,7
A	243 169 6 G	32,9	15,0	0,0	0,8
A	243 189 6 H	35,7	17,8	0,0	0,9

RID-Platte 5

Präparat	Charge	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgG3 (mg/ml)	IgG4 (mg/ml)
C	140 1073	30,7	18,5	0,4	1,2
C+	141 195	23,4	22,6	0,2	2,1
M+	X 646 R 001	34,6	14,0	4,0	0,7
E	304 011	29,4	10,5	1,6	1,9
E+	032 011	21,2	11,8	0,7	2,1

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kabelitz und besonders Frau Dr. Schöffner für die Themenstellung und Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thiel danke ich für die kritische Durchsicht und Vertretung der Arbeit gegenüber der tierärztlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Giessen.

Herrn Dr. Krafft danke ich herzlichst für seine Beratung in allen wissenschaftlichen Angelegenheiten.

Herrn Dr. Wedekind danke ich herzlichst für die theoretische Einführung in das Thema und für die vielen wertvollen Diskussionsstunden.

Frau Marie-Luise Eckert-Ziem, Frau Tanja Kayser, Frau Antje Tönjes und Frau Ingrid Adamczyk aus dem FG 3/2 danke ich herzlich für die Einarbeitung in die serologischen Arbeitsmethoden und ihre Hilfe bei den anfallenden Laborarbeiten.

Herrn Dr. Wilhelm danke ich für seine Hilfe bei statistischen Fragen.

Herrn Dr. Boller danke ich für die Einweisung und Bereitstellung von fotografischen Arbeitsmitteln.

Frau Dr. Willkommen, Herrn Dr. Chudy, Herrn Dr. Nübling und deren Mitarbeitern/innen danke ich für die Einarbeitung in die PCR-Methoden.

Herrn Dr. Christians, Herrn Dr. Giess und den Mitarbeiterinnen aus dem FG 2/3 danke ich für die Einarbeitung in die Methoden der Proteinanalytik.

Allen nicht genannten Mitarbeitern/innen des Paul-Ehrlich-Instituts, die mich bei meiner täglichen Arbeit auf unterschiedlichste Weise unterstützten, danke ich für ihr freundliches Entgegenkommen und ihre stete Hilfsbereitschaft.