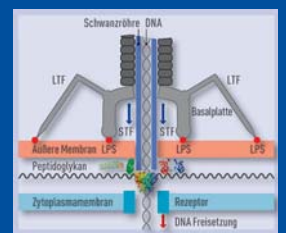


*Guidance
Pyrogen and Endotoxin
Questions and Answers*

*Additional copies are available from:
FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Division of Drug Information, Silver Spring, MD 20910
Phone: 301-796-3442 Fax: 301-796-3443
drugsinfo@fda.hhs.gov
Drug Guidance Compliance Regulatory
Communication, Outreach and Development
Evaluation and Research, Food and Drug Administration*



Publikationen zum Thema: Nachweis von Endotoxinen

Sonderdruck



To pool or not to pool ...?

Oder: wie sollten Mischmuster (A/M/E) im LAL-Test richtig geprüft werden?

Die allen endotoxinkundigen wohlbekannte FDA Guideline zum *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-(LAL)-Test aus dem Jahr 1987, erhielt 2012 neuen Schwung.

Das Regelwerk, fast ein Vierteljahrhundert gültig, fixierte die Rahmenbedingungen für die verschiedensten Belange der Endotoxintestung: die matrixspezifische Validierung, die Analyse von „Medical Devices“ und natürlich die Testung von Einzelproben mit den einschlägigen Methoden. Neben der Einzelmusterprüfung wird aber auch grundsätzlich die Analyse von Mischmusterproben erlaubt, also z. B. von gepoolten Proben aus „Anfang“, „Mitte“ und „Ende“ des Herstellungsprozesses einer Charge.

Der „*Casus knaxus*“ im Fall der Nutzung von Mischmusterprüfungen liegt in der Berechnungsgrundlage des Endotoxinlimits bzw. der maximal validen Verdünnung (MVD).

Bis zur Veröffentlichung des Dokuments „*Guidance for Industry; Pyrogen and Endotoxins Testing – Questions and Answers*“ im Jahr 2012 traf die FDA diesbezüglich

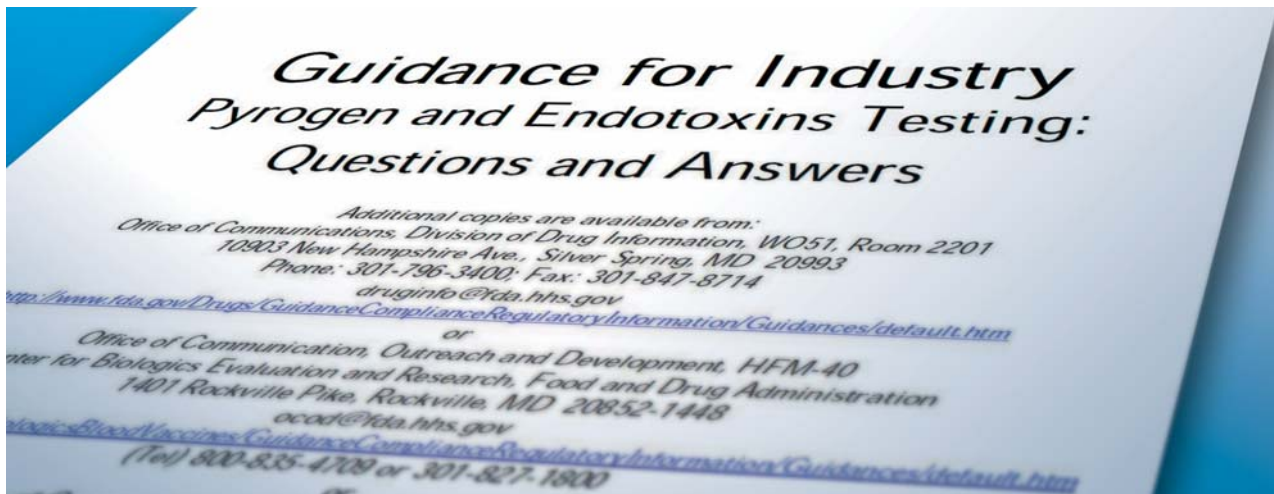
keinerlei Aussage und schaffte damit experimentell eine Grauzone im Bereich der Mischmusterprüfungen. Hintergrund ist: im Fall gepoolter Proben kann infolge des Mischmusteransatzes eine potentiell vorhandene Endotoxinlast eines Musters unter den Grenzwert verdünnt und somit nicht mehr detektiert werden. Trotz der tiefgreifenden Bedeutung einer Mischmusterprüfung für die Produkt- und damit Patientensicherheit ist diese Fragestellung in Europa erstaunlicherweise nach wie vor regulatorisch nicht adressiert.

Die geforderte Berechnungsgrundlage für Mischmusterprüfungen sieht eine Berücksichtigung der Anzahl der Einzelproben vor, die zu einem Mischmuster vereint werden. Hierbei ist die maximal für ein Produkt gültige Verdünnung (MVD) durch den Faktor der Prüfmusteranzahl zu dividieren („adjustedMVD“). Bei Mischmustern aus „Anfang“, „Mitte“ und „Ende“ würde somit die MVD (damit zwangsläufig das Endotoxinlimit) durch 3 geteilt werden müssen, was zu einem entsprechend sensitiverem Testverfahren führt.

Trotz fehlender regulatorischer Vorgaben im europäischen Raum, empfiehlt die Labor L+S AG die Berechnungsgrundlagen und Verdünnungen der Prüflösungen für Mischmusterprüfungen entsprechend anzupassen.

Im Fall bereits validierter Prüfverfahren ist die Umsetzung dieses Vorgehens auf Umsetzbarkeit zu prüfen. Falls erforderlich, ist das Testverfahren unter Berücksichtigung der Gegebenheiten einer Mischmusterprüfung erneut produktspezifisch zu validieren, um die Nutzbarkeit dieses Vorgehens einerseits experimentell sicherzustellen als auch die regulatorischen Anforderungen an den LAL-Test andererseits zu wahren. Demgegenüber bietet die Einzelmusterprüfung, also die separate Testung von z. B. Anfang, Mitte und Ende, die größtmögliche Sicherheit bei der Prüfung eines Mustersets.

Bildquelle „*Limulus*“:
[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Limulus_polyphemus_\(aquarium\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Limulus_polyphemus_(aquarium).jpg)



Ein Sensibilisierungs-Exposé zur LAL-Testung

Die "Guidance for Industry" der FDA zur Pyrogen- & Endotoxin-Testung

Nach Rücknahme der altherwürdigen FDA Guideline zum *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-(LAL)-Test aus dem Jahr 1987 durch die FDA wurde im Sommer 2012 das Richtlinien-Dokument „Guidance for Industry; Pyrogen and Endotoxins Testing – Questions and Answers“ durch die US-Behörde offiziell eingeführt.

Explizit wurden von Seiten der FDA die in der USP und dem AAMI ST72 niedergeschriebenen Empfehlungen zum Bakterien-Endotoxin-Test aufgegriffen, erweitert und in 13 Kapiteln präzisiert. Das neue Dokument gibt das „current thinking“ der FDA zu diesem Themenkomplex wieder.

Die Labor L+S AG möchte für Sie im Nachfolgenden stichpunktartig einige der wichtigsten regulatorischen Schwerpunktsetzungen der FDA zum LAL-Test herausstellen.

Der Einfluss der Probenlagerung auf die Nachweisbarkeit von Endotoxinen im Produkt muss experimentell charakterisiert sein, um z. B. niedrige Wiederfindungsraten von Endotoxinen im LAL-Test durch probenbedingte Maskierungseffekte zu erklären.

Die Vorgehensweise zur Analyse von paritätischen Mischmustern einer Herstellungscharge (z.B. Anfang, Mitte & Ende) bei wässrigen Fertigarzneimitteln, Suspensionen, In-Prozess-Kontrollen und „Medical Devices“ wird erstmalig genauer definiert.

Die FDA fokussiert bei der Analyse von gepoolten Proben auf die Notwendigkeit von Homogenität in der Probenmatrix als auch auf die Nutzung der „adjustedMVD“ (MVD dividiert durch die Anzahl der Teilproben eines Mischmusters) als wichtigen Analysenparameter, um ein sensitiveres Nachweisverfahren abzubilden und so ein

etwaiges „Herausverdünnen“ von Endotoxinen einer kontaminierten Teilprobe im gepoolten Mischmuster zu minimieren.

Um eine gleichbleibend hohe Qualität des jeweiligen pharmazeutischen Endproduktes zu erzielen, sollen Herstellerfirmen im Rahmen eines „Quality by Design“ Konzepts durch kontinuierliche In-Prozess-Kontrollen kritische Prozessabläufe und -bereiche charakterisieren und monitoren, die zur Bildung bzw. zum Eintrag von Endotoxinen in den Herstellungsprozess führen können.

Durch quantitative LAL-Testungen mittels kinetisch-turbidimetrischer oder kinetisch-chromogener Methodik sollen so eventuelle Trends bereits im Vorfeld eines OOS erkannt werden.

Bei Parenteralia für allgemein-veterinärmedizinische Applikationen muss das Endotoxinlimit an die maximale Dosis für die jeweils kleinste Art angepasst sein, für die das Produkt Anwendung findet. Wird das jeweilige Produkt auch für Jungtiere genutzt, gilt hier für die Kalkulation des Endotoxinlimits das Jungtier als „worst case“-Szenario.

Routinetestungen am Endprodukt, und daher auch folglich das zugehörige Validierungsprozedere, sollen so abgebildet werden, dass eine möglichst hohe Produktkonzentration im LAL-Test benutzt und analysiert wird, die aber dennoch keine hemmende bzw. verstärkende Eigenschaft gegenüber dem LAL-Test zeigt. Maximal zulässige Verdünnungen, d.h. die LAL-Testung an der MVD, sind hierbei zu vermeiden. Ist dies experimentell möglich, führt diese Vorgehensweise zu einem möglichst sensitiven Nachweisverfahren gegenüber Endotoxinen.

Die Labor L+S AG hatte überdies die Möglichkeit im persönlichen Gespräch mit

Herrn Dr. Robert J. Mello, dem zuständigen Senior Review Microbiologist vom Center for Drug Evaluation and Research der FDA auf der European Compliance Academy-Konferenz 2012 zum Thema „Endotoxin & Pyrogen Testing“ in Frankfurt/Main, einen tieferen Einblick in aktuelle Diskussionspunkte der FDA zum LAL-Test und somit mögliche zukünftige regulatorische Anforderungen zu erhalten. Dieses Wissen möchten wir mit Ihnen teilen:

Für pharmazeutische Produkte, die als „Kit“ aus zwei oder mehreren individuell verpackten Komponenten bestehen und zur zeitgleichen Administration bestimmt sind (z.B. Lyophilisat & Diluent), sollen die Endotoxinlimits der Einzelkomponenten bei der Kalkulation des Endotoxinlimits der Gesamtdarreichung berücksichtigt werden.

Validierungen müssen an mindestens drei Produktchargen erfolgen. Es wird explizit darauf hingewiesen, dass für Validierungszwecke keine Chargen aus Entwicklungsprozessen, klinischen Lots oder nicht-großtechnischer Produktion herangezogen werden dürfen. Chargen, die für Validierungsprozesse bestimmt sind, sollen großtechnische Formulierungsansätze aus großtechnischen Produktionsabläufen abbilden. Falls an mehreren Produktionsstätten die Produktherstellung erfolgt, soll je Produktionsstätte eine Charge in den Validierungsprozess eingebunden werden.

Ein weiteres Augenmerk von Seiten der FDA liegt auf der Kalkulation und Spezifikationsfestlegung von Endotoxinlimits bei parenteralen Arzneimitteln, die in pädiatrischen und adulten Applikationen Anwendung finden. Hier muss unter Beachtung von Körperoberfläche und -gewicht des Patienten der konservativere Grenzwert als „worst case“-Szenario genutzt werden.



Risikobewertung bei LAL-Validierungen

Die analytischen Gesichtspunkte beim Validierungsprozess

In der allgemeinen, produktspezifischen Validierung der Methoden des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-(LAL)-Tests auf Bakterien Endotoxine wird unter anderem geprüft, ob Störfaktoren in der zu testenden Substanz enthalten sind, die auf den Test einwirken und so die Ergebnisse verfälschen können.

Drei-Chargen-Prüfung gemäß Europäischer Pharmakopöe und FDA

Die Verdünnungsstufe, bei der die Testsubstanz keinerlei Hemmung oder Verstärkung der LAL-Reaktion hervorruft (Endotoxinwiederfindung 50–200%), wird für die weitere Validierung eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit und Wiederholpräzision der Testergebnisse unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zu demonstrieren.

Die Ph. Eur. gibt hier die Anforderung, bei der Testung von neuen Produkten den Einfluss matrixspezifischer Verstärkungs- und Hemmungseffekte auf den LAL-Test an wenigstens drei Produktchargen zu analysieren (Ph. Eur., Kapitel 5.1.10). Die aktuelle USP lässt eine derartige Forderung in Bezug auf die Anzahl zu testender Produktchargen missen (USP, Kapitel <85>). Dies wird jedoch von Seiten der FDA aktiv gefordert.

Interessanterweise forderten ältere Ausgaben der USP allerdings eine „adäquate Demonstration“, dass keine Störfaktoren

auf den Test einwirken, um valide Testergebnisse zu erzielen.

Erfassung der Varianz

Die Richtlinie der Ph. Eur. im Validierungsprozess eine Testung an drei Chargen durchzuführen, ist bei einer Produktherstellung im industriell-pharmazeutischen Umfeld absolut sinnvoll und aus folgenden Gründen erforderlich: Durch das chargenübergreifende Vorgehen wird neben dem produktspezifischen Einfluss auf den LAL-Test auch die Varianz des vorgeschalteten Herstellungsprozesses der Testsubstanz bzw. des Arzneimittels sowie der mögliche Einfluss der verwendeten Chargen an Ausgangsstoffen in den Validierungsprozess mit einbezogen.

Davon unabhängig umfasst der Validierungsprozess an jeder einzelnen Charge grundsätzlich die Testung der einschlägigen Negativ- und Positiv-Kontrollen im Doppelansatz und die Störfaktortestung im Vierfachansatz, um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu analysieren und die Systemtauglichkeit zu belegen.

Sonderfall: Klinikmuster

Im Falle einer einzelnen Klinikmustercharge entfällt durch das singuläre Herstellungsverfahren natürlich *per se* die Grundlage für eine chargenübergreifende Validierung des Testverfahrens. Hier muss der analytische Schwerpunkt der Validierung ausschließlich auf der Charakterisierung des Einflusses von eventuellen

Störfaktoren auf den LAL-Test, dessen Reproduzierbarkeit und Wiederholpräzision im Laboralltag liegen.

Dies trifft ebenso für den Fall zu, dass zwischen den Herstellungsterminen einzelner Produktionschargen größere Zeiträume liegen und so die Verfügbarkeit mehrerer Chargen am Beginn der Produktion limitiert ist. Die Ergebnisse des Tests an einer einzelnen Klinikmustercharge oder ersten Produktionscharge sind aber als valide für die getestete Charge anzusehen, wenn die im obigen Absatz beschriebene Negativ- und Positiv-Kontrolle sowie die Störfaktortestung durchgeführt worden sind.

Matrixspezifische Validierung

Aus dem Aspekt der Produktsicherheit muss aber die matrixspezifische Validierung das Analyseverfahren so umfassend abbilden, dass die Varianz der jeweiligen Ausgangsmaterialien, des gegebenen Herstellungsprozesses und der Prüfsubstanz darin mit eingeschlossen ist. Die Ph. Eur., die einen chargenübergreifenden Validierungsprozess an drei Chargen explizit fordert, adressiert gerade dieses wichtige Qualitätsmerkmal.

Daher sollten nach der Herstellung weiterer Produktionschargen diese in den zeitlich aufgetrennten Validierungsprozess eingepflegt werden, bis die matrixspezifische Validierung an wenigstens drei Chargen vollständig abgeschlossen ist.



Leicht ins Auge gegangen

Ausbrüche von TASS als direkte Folge einer Endotoxin-Kontamination erforderten eine neue FDA-Guidance

Im vergangenen Jahrzehnt ist es in den USA wiederholt zu unerklärlichen Ausbrüchen steriler, nicht-infektiöser Entzündungen des menschlichen Augapfels nach intraokularen Operationen gekommen.

Typische Symptome waren hierbei eine deutliche Sehverschlechterung, ein ausgeprägter, schmerzhafter Reiz- bzw. Entzündungszustand in der Augen-Vorkammer (vorderes Segment) sowie ein ausgeprägtes Hornhautödem. In der Regel stellten sich diese Symptome postoperativ bereits nach wenigen Stunden als klinisch akut dar. Der Verdacht auf eine operative Kontamination des intraokularen Gewebes im vorderen Augenabschnitt mit pathogenen Keimen bestätigte sich jedoch nicht (Augenspiegel 03/2009). Das daraus abgeleitete Krankheitsbild charakterisiert heute das sogenannte „Toxic Anterior Segment Syndrome (TASS)“.

Forschungen konnten dabei einen direkten Zusammenhang zwischen der Erkrankung des Auges und intraokular genutzten, potenziell mit Endotoxin kontaminierter Medizinprodukten herstellen, die bei operativen Eingriffen angewandt wurden. Der Grund für das hohe Risiko einer Endotoxin-Kontamination dieser Medizinprodukte liegt in der Natur der Produkte selbst:

- viskos-wässrige Produkteigenschaften (z. B. Linsen)

- wässrige Lagerungsmilieus für diese Produkttypen
- Ausgangsstoffe aus biologischer Herkunft (z. B. Natrium-Hyaluronsäure)

Diese Eigenschaften ermöglichen und begünstigen Bakterienwachstum und resultieren im Kontaminationsfall in einer hohen Endotoxinlast des finalen Medizinproduktes.

Um zukünftig Ausbrüche von TASS als direkte Folge einer Endotoxin-Kontaminationen bei Medizinprodukten zur intraokularen Anwendung zu minimieren bzw. gänzlich zu verhindern, hat die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) die neue Guidance „*Endotoxin Testing Recommendations for Single-Use Intraocular Ophthalmic Devices*“ für die folgenden Produktklassen im Sommer 2015 aufgelegt.

- **Flüssigkeiten zur intraokularen Anwendung**
- **Medizinprodukte für das vordere Augensegment**
(z. B. Linsen, Kapselspannringe, Glaukom-Drainagen usw.)
- **Medizinprodukte für das hintere Augensegment**
(z. B. Retina-Prothesen bzw. Implantate)

Die neue Guideline bestätigt allgemein die analytische Vorgehensweise beim Test auf Bakterien Endotoxine gemäß den bekannten Vorgaben der USP <85> und des American National Standard Instituts (ANSI/AAMI ST72).

Von der FDA werden jedoch u. a. strengere Endotoxingrenzwerte für *Ophthalmic Viscosurgical Devices* (OVDs) und *Ophthalmic Implants-Intraocular Lenses* (IOLs) gefordert, als aktuell in ISO 15798, ISO 11979-8 oder ANSI festgehalten sind. Hintergrund: Trotz Einhaltung der aktuellen Grenzwerte reichen entsprechende Endotoxinmengen aus, um Entzündungsreaktionen im Augengewebe hervorzurufen.

Neben den Endotoxingrenzwerten dieser Produktklassen reguliert die neue Guideline auch das experimentelle Vorgehen zur Probenvorbereitung im LAL-Test mittels Extraktionsverfahren. Erstmals wird hierfür die „*Hard-Spike*“-Analytik zur Ermittlung der Endotoxinwiederfindung (Low Endotoxin Recovery – LER) im Vorfeld einer produktspezifischen Validierung von der FDA gefordert und das experimentelle Vorgehen detailliert beschrieben. Zusätzlich wird die Möglichkeit des Einsatzes von Enzymen beschrieben, um Störfaktoren auf den LAL-Test zu eliminieren.



ELISA meets Endotoxins

Beim Nachweis und der Quantifizierung von Endotoxinen erzielt der EndoLISA® Assay gleichwertige bzw. bessere Ergebnisse als der herkömmliche LAL-Test. Die Aufnahme in das Leistungsverzeichnis der Labor L+S AG ist bereits erfolgt.

EndoLISA® von Hyglos ist ein neuer, ELISA-basierter Testkit zum Nachweis und zur Quantifizierung von Endotoxinen. Das rekombinante Testsystem findet aktuell Eingang in den pharmazeutischen Markt und stellt eine Alternative zum bestehenden *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) gemäß Europäischem Arzneibuch (Kapitel 5.1.10) und US-amerikanischem Arzneibuch (Kapitel 6.30) dar. Darüber hinaus ist das Verfahren in der *FDA-Guidance for Industry: „Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers“* als Alternativmethode gelistet.

Das experimentelle Testprozedere umfasst die Nutzung von Mikrotiterplatten, die mit rekombinant hergestellten lipopolysaccharid-spezifischen T4-Bakteriophagenproteinen beschichtet sind. Diese Proteinstrukturen vermitteln die Erkennung und sterische Bindung von Lipopolysacchariden (LPS = Endotoxine) auf der Oberfläche Gram-negativer Mikroorganismen wie z. B. *Escherichia coli*.

Der EndoLISA® eignet sich für gelöste Feststoffe und „flüssige Zubereitung“ der parenteralen Anwendung, In-Prozess-Kontrollen sowie Wasserproben. Falls erforderlich werden die Proben verdünnt und in die Mikrotiterplatte überführt. Befinden sich Endotoxine in der zu prüfenden Lösung, binden diese im Verlauf der Inkubation spezifisch an die Bakteriophagenproteine. Das beim Prüfverfahren eingesetzte Puffersystem stabilisiert den pH-Wert der Prüflösung innerhalb des validen pH-Bereiches des Testsystems von pH 4 bis pH 9. Im Anschluss an die Inkubation werden potenziell interferierende Produktreste durch mehrfaches Waschen der Mikrotiterplatte entfernt.

Die Detektion der gebundenen Lipopolysaccharide erfolgt durch einen ebenfalls rekombinant hergestellten *Limulus*-Faktor C. Das Faktor C Protein (rFC) wird durch Kontakt mit LPS aktiviert und spaltet ein Substrat, das mittels Fluoreszenzphotometrie (Filter: Ex 380/20 – Em 440/40) quantifiziert

wird. Die dabei gemessene Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zu der in der Probenlösung enthaltenen Endotoxin-Konzentration. Da durch die Verwendung des rFC nur ein enzymatisch-funktioneller Teilabschnitt der klassischen LAL-Clotting-Kaskade des Pfeilschwanzkrebses ausgenutzt wird, sind Testinterferenzen durch β -Glukane *per se* ausgeschlossen.

Durch den Einsatz von ausschließlich rekombinant hergestellten Proteinen – wie dem *Limulus*-Faktor C und den Bakteriophagenproteinen – leistet der EndoLISA® seinen Beitrag zur Sicherung der Pfeilschwanzkrebspopulation.

Das EndoLISA®-Testverfahren verfügt über einen dynamischen Messbereich von vier log-Stufen (0,05 – 500 EU/ml). Die Kombination aus Fluoreszenz als Detektionsmethode, einem geeigneten *Multi-Detection-Reader* und der Verwendung der Datenanalyse-Software Gen5™ von BioTek Instruments ermöglicht eine hohe Präzision.

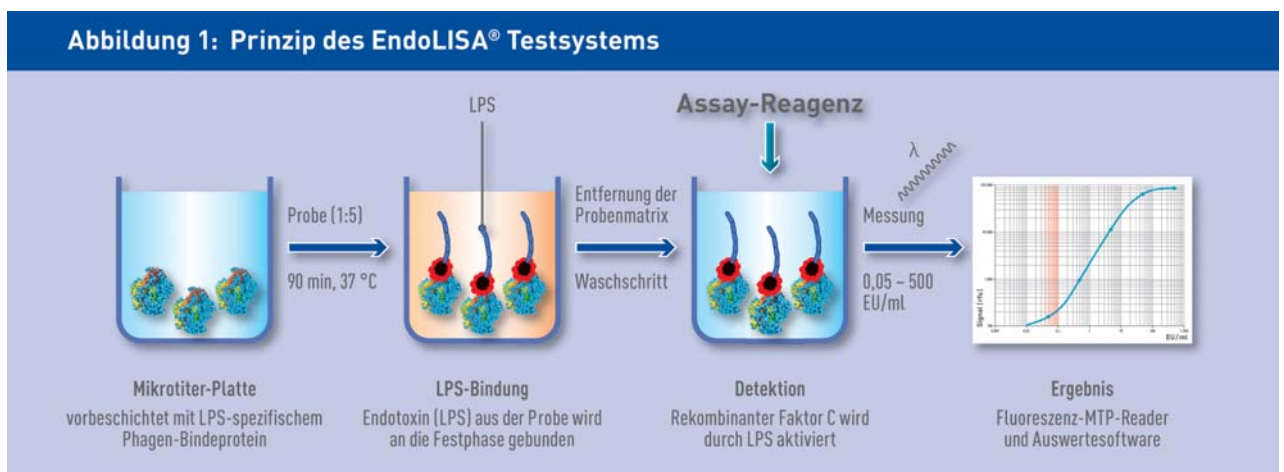


Abbildung 1: **Prinzip des EndoLISA® Testsystems**

Endotoxine (LPS) binden an die mit Bakteriophagen vorbereichete Mikrotiterplatte. Interferierende Substanzen werden durch Waschschritt entfernt. Die proteolytische Funktion des rekombinanten Faktors C wird durch Lipopolysaccharide aktiviert. Dies führt zur Spaltung eines fluoreszierenden Substrats. In Abhängigkeit der detektierten Fluoreszenz wird der Endotoxingehalt der Prüflösung ermittelt. Der rekombinante Faktor C ersetzt die Verwendung der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*, das im *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) eingesetzt wird. Quelle: www.hyglos.de

Abbildung 2: Infektionsablauf einer Gram-negativen Zelle durch einen T4-Bakteriophagen

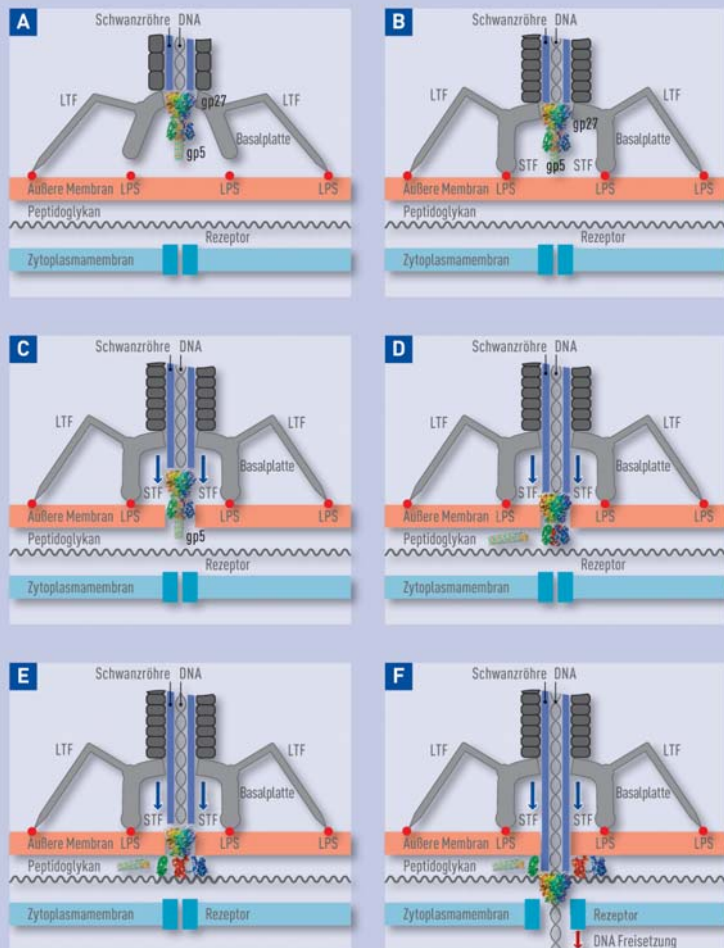


Abbildung 2:

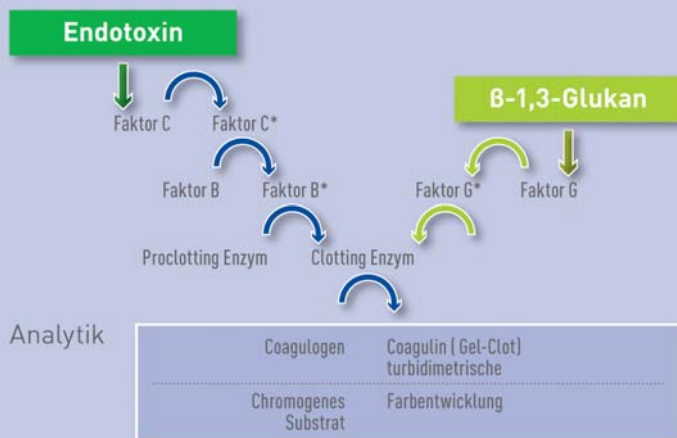
Infektionsablauf einer Gram-negativen Zelle durch einen T4-Bakteriophagen.

- A:** Der T4-Phage erkennt die LPS-Moleküle auf der Oberfläche von *E. coli* mithilfe der Long-Tail-Fibres (LTF);
- B:** Anheften des Phagen mit der Basalplatte an die Oberfläche der Zelle durch Short-Tail-Fibres (STF);
- C:** Die Kontraktion des Schwanzes führt zur Punktion der äußeren Zellmembran durch die GP5-Nadel;
- D:** GP5c dissoziiert von der Schwanzröhre, wodurch 3 Lysozymdomänen aktiviert werden;
- E:** Lyse der Peptidoglykanschicht durch Lysozym;
- F:** Assoziation von Protein GP 27 mit einem spezifischen Rezeptor der inneren Membran und Freisetzung der Bakteriophagen-DNA in das Zytoplasma.

Quelle:

“Structure and morphogenesis of bacteriophage T4”
 G. Leimana, S. Kanamarua,
 V. V. Mesyanzhinov, F. Arisakac
 and M. G. Rossmanna

Abbildung 3: Enzymkaskade LAL-Test



Enzymkaskade EndoLISA®

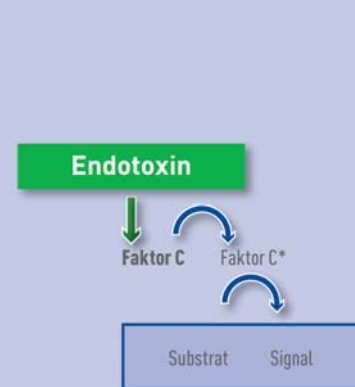


Abbildung 3: **Enzymkaskade des LAL-Tests**

Die linke Grafik stellt den Ablauf der Enzymkaskade des LAL-Tests in Abhängigkeit des Faktors C sowie den Einfluss von β -Glukanen auf das Testsystem dar. Als Oberflächenstrukturen von Hefen und Pilzen sowie als produktionsbedingte Rückstände führen β -Glukane bei der Prüfung auf Bakterien-Endotoxine mittels LAL-Test zu falsch-positiven Ergebnissen, indem eine Aktivierung des Limulus Protein-Faktor G zur weiteren Aktivierung der Gelbildungsenzyme führt. Die Grafik rechts zeigt den Ablauf der Enzymkaskade rekombinanter Endotoxin-nachweisverfahren wie dem EndoLISA® von Hyglos. Durch den direkten Nachweis von aktiviertem Faktor C [C*] durch eine Endotoxinkonzentration-abhängige Substratumwandlung kommt es zu keinen falsch-positiven Ergebnissen durch β -Glukane.

Quelle: Webinar – Endotoxinmaskierung und Low Endotoxin Recovery [Johannes Reich] vom 25. September 2014.

Abbildung 4:	Substanz	Lösungsmittel	LAL-Test	EndoLISA®	Verbesserung mit EndoLISA® (Faktor)
Puffer/pH-Wert	Acetat (pH 4,0)	100 mM NaCl	12,5 mM	50 mM	4
	Acetat (pH 5,0)	100 mM NaCl	12,5 mM	100 mM ¹⁾	> 8
	MES (pH 6,0)	100 mM NaCl	5 mM	100 mM ¹⁾	> 20
	Kaliumphosphat (pH 7,2)	100 mM NaCl	50 mM	100 mM ¹⁾	> 2
	Imidazol (pH 7,4)	Wasser	40 mM	500 mM ¹⁾	> 12,5
	HEPES (pH 7,5)	100 mM NaCl	100 mM ¹⁾	100 mM ¹⁾	1
	Natriumborat (pH 9,0)	100 mM NaCl	50 mM	100 mM ¹⁾	> 2
Salz	NaCl	Wasser	0,5 mM	1 mM	2
	KCl	Wasser	0,25 mM	1 mM	4
Chaotrophe Agenzien	Harnstoff	Wasser	0,5 mM	6 mM	12
	Guanidiniumchlorid	Wasser	0,05 mM	1 mM	20
Organische Lösungsmittel	Methanol	Wasser	5 %	20 % ¹⁾	> 4
	Ethanol	Wasser	0,5 %	30 %	60
	2-Propanol	Wasser	0,2 %	20 %	100
	DMSO	Wasser	2 %	10 %	5
Detergenzien	SDS	Wasser	0,001 %	0,05 %	50
	CTAB	Wasser	0,0001 %	0,004 %	40
	Zwittergent 3 – 14	Wasser	0,005 %	0,02 %	4
	Tween 20	Wasser	0,1 %	2 %	20
	Triton X-100	Wasser	0,005 %	0,02 %	4
Chelatoren	EDTA (pH 8,0)	Wasser	0,4 mM	0,4 mM	1
	Citrat (pH 7,5)	Wasser	10 mM	10 mM	1
Protease-Inhibitoren	Benzamidin	Wasser	0,1 mM	100 mM ¹⁾	> 1.000
	PMSF	2-Propanol	< 0,05 mM	5 mM	> 100
Antibiotika	Rifampicin	Methanol	0,04 mg/ml	3,5 mg/ml	100
	Chloramphenicol	Ethanol	0,1 mg/ml	3,5 mg/ml	35

¹⁾Höchste getestete Konzentration

Die getesteten Substanzen wurden im oben angegebenen Lösungsmittel gelöst und serielle Verdünnungen in Wasser bzw. 0,1 M Natriumchloridlösung hergestellt. Anschließend wurde 5 EU/ml LPS (*E. coli* O55:B5) zugegeben und die Tests nach Herstellerangaben durchgeführt. Die EU/ml-Werte und die Wiederfindung in Prozent an zugegebenem LPS wurden berechnet. Eine valide LPS-Wiederfindung war für einen Bereich zwischen 50 und 200 % des zugegebenen LPS definiert.

Abbildung 4:

Vorteile die EndoLISA® hinsichtlich des Probenspektrums im Vergleich zum LAL-Test bietet

Geht es um die maximalen Konzentrationen der einzelnen Stoffe, so bietet EndoLISA® über nahezu alle Produktgruppen hinweg Vorteile gegenüber dem LAL-Test.

Teilweise verbessert sich die maximale Substanzkonzentration um den Faktor 1.000 (Benzamidin). Dies bietet zudem neue Möglichkeiten in der Probenaufbereitung.

Nur in wenigen Ausnahmefällen wird hinsichtlich der maximalen Substanzkonzentration kein Verbesserungsfaktor erreicht (z. B. Chelatoren).

Quelle: www.hyglos.de

Die Etablierung der Methode bei der Labor L+S AG ergab eine Intra-Assay-Präzision kleiner als 11 Prozent und eine Inter-Assay-Präzision kleiner als 13 Prozent (Vierfachbestimmung von fünf Endotoxinkonzentrationen im Messbereich des Testsystems an zwei aufeinander folgenden Tagen).

Eine bei der Labor L+S AG durchgeführte wissenschaftliche Arbeit zeigte, dass EndoLISA® operative und experimentelle Vorteile bei den aus dem LAL-Test bekannten Testinterferenzen durch organische Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, DMSO), bivalente Metallionen (Kalzium, Magnesium) und chaotropen Agenzien (Harnstoff, SDS) bei der Prüfung auf Bakterien Endotoxinen aufweist. Bei Proteinlösungen konnten Konzentrationen von bis zu 100 mg/ml (Humanes-Serumalbumin) analysiert werden, wohingegen im klassischen LAL-Test meist nur Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml möglich sind.

Die Prüfung höherer Chemikalienkonzentration ohne Testinterferenzen bietet neue Möglichkeiten der Vorbereitung von Proben, wie das Emulgieren öligere Zubereitungen durch organische Lösungsmittel,

die Denaturierung interferierender Proteinkomponenten oder den Einsatz sogenannter Demaskierungskits zur Aufhebung von Endotoxinmaskierungseffekten.

Der Nachweis der Eignung des EndoLISA®-Testsystems zum Nachweis und zur Quantifizierung von Bakterien Endotoxinen in proteinhaltigen Zubereitungen (jeweils unter Einhaltung der Vorgaben aus dem Europäischen, Japanischen und US-amerikanischen Arzneibuch) konnte im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit erbracht werden. Fazit: EndoLISA® liefert im Vergleich zum LAL-Test mindestens vergleichbare, bei bestimmten Substanzgruppen sogar bessere Ergebnisse.

Haben wir Ihr Interesse an dieser neuartigen Endotoxinnachweismethode geweckt? Oder haben Sie spezielle Fragen zu diesem Themenkomplex? Dann kontaktieren Sie unsere Ansprechpartner für den Bereich der Endotoxinbestimmung.



EndoLISA®-Testsystem

Geringere Interferenzen

Endotoxinmaskierungen sind der Albtraum jeder Endotoxin-Prüfung. Das EndoLISA®-Testsystem von Hyglos bietet hier neue Möglichkeiten der Probenvorbereitung, u. a. durch den Einsatz von „Demaskierungskits“.

Ein EndoLISA®-Kit der Firma Hyglos zur Demaskierung von Endotoxin (LER).

Quelle: Hyglos GmbH, Bernried.

Das Phänomen der Endotoxinmaskierung ist ein aktuell oft diskutierter Aspekt bei der Prüfung auf Bakterien Endotoxine unter Verwendung des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Test). Insbesondere bei biopharmazeutischen Formulierungen auf Proteinbasis kann es in Kombination mit Komplexbildnern (z. B. Citrat, Phosphat) und Detergenzien zu einer Maskierung von Lipopolysacchariden (LPS = Endotoxine) durch die Arzneimittelkomponenten kommen.

Aufgrund der daraus resultierenden, zu geringen Endotoxinwiederfindungsraten wird das Auftreten von Endotoxinmaskierungen auch als „Low Endotoxin Recovery-Effect“ (LER) bezeichnet. Die in der Diskussion stehenden, möglichen Ursachen für das Auftreten von Endotoxinmaskierungseffekten sind komplex und vielfältig. Darüber hinaus ist die Entwicklung, Optimierung und Validierung geeigneter Verfahren zum Nachweis von Bakterien Endotoxinen an Produkten mit bekanntem LER-Effekt aufwendig – zeitlich wie finanziell.

Die Maskierung von Endotoxinen führt unter Umständen zu einem falsch-negativen Prüfungsergebnis. Das birgt wiederum ein erhöhtes Risiko für die Patientensicherheit, da möglicherweise in Arzneimitteln enthaltene Endotoxine nicht sicher quantifiziert bzw. nachgewiesen werden können.



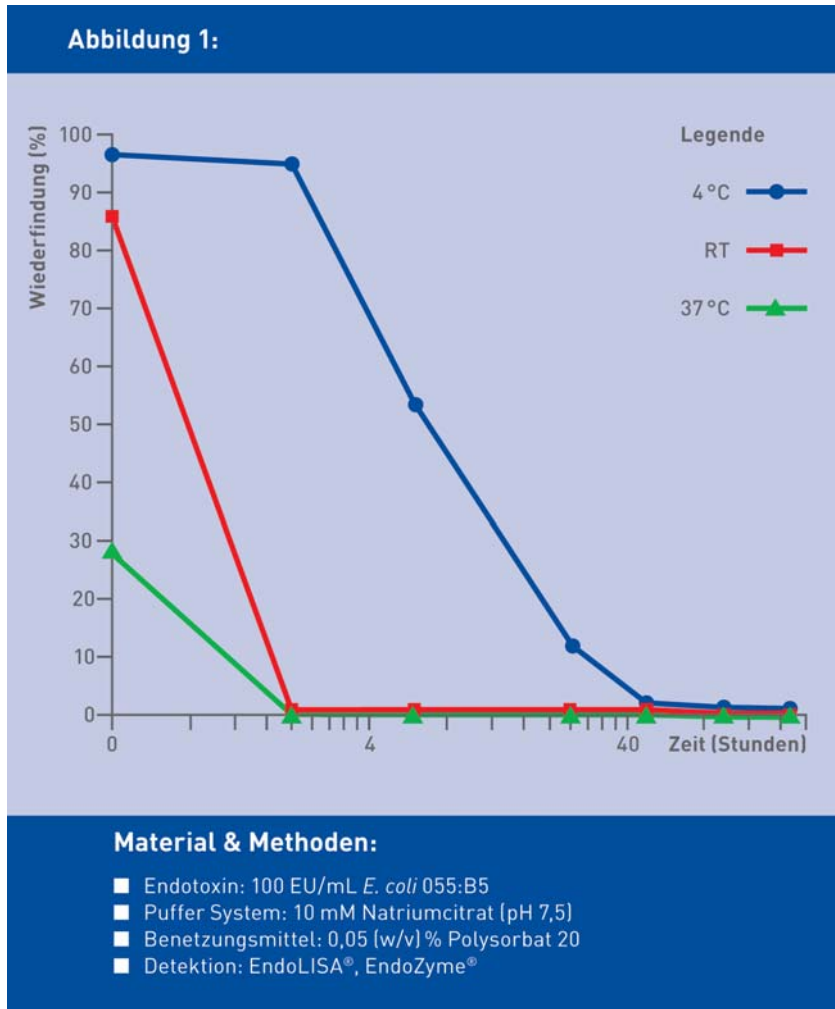


Abbildung 1:

Die Abbildung zeigt die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Endotoxinmaskierung für eine 10 mM Natriumcitrat-pufferlösung pH 7,5 mit 0,05 % (w/v) Polysorbat 20.

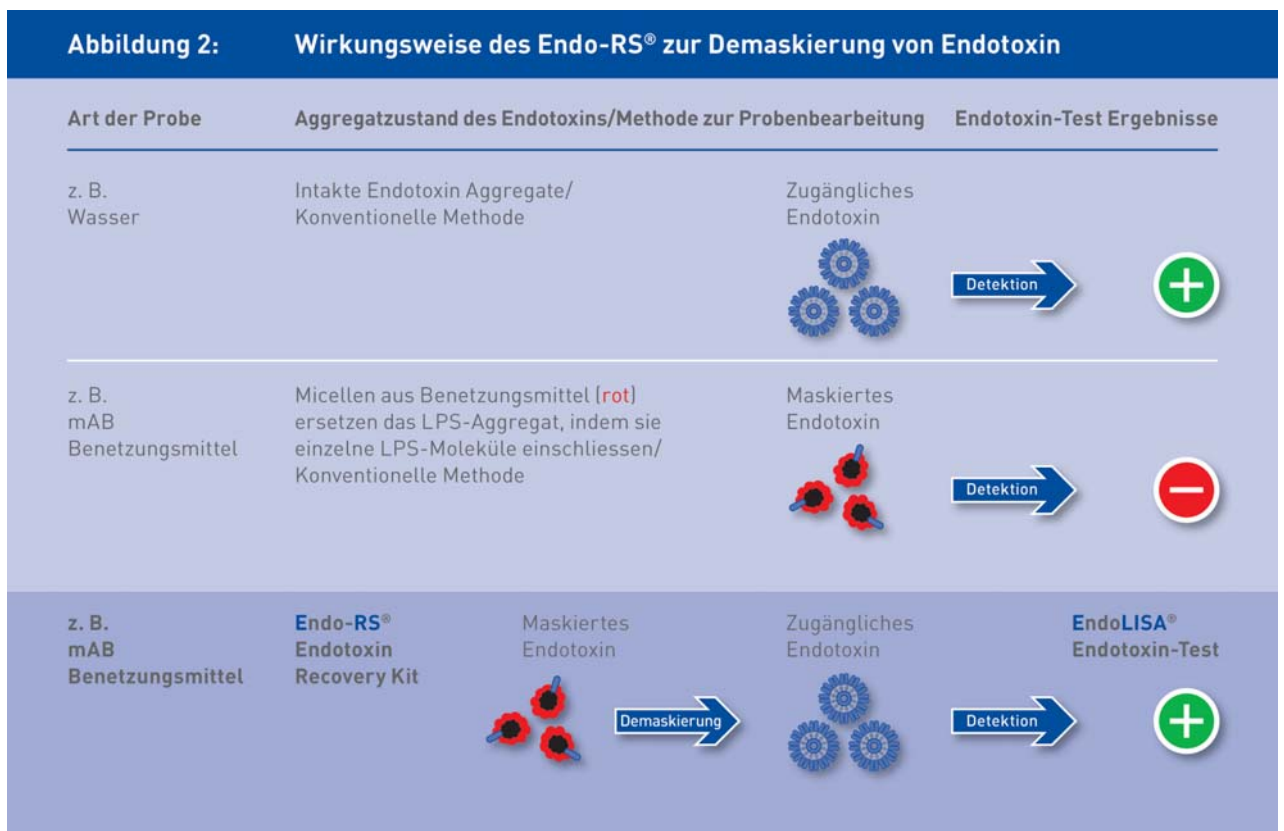
Mit steigender Temperatur nimmt die Endotoxinmaskierung zu. Nach rund 48 Stunden sind die beaufschlagten Endotoxine bei allen Temperaturbedingungen kaum noch nachweisbar.

Im Gegensatz zu den aus dem LAL-Test hinreichend bekannten und mehrfach publizierten Testinterferenzen durch organische Lösungsmittel (z. B. Methanol, Ethanol, DMSO), bivalente Metallionen (Kalzium, Magnesium) und chaotrope Agenzien (Harnstoff, SDS) können LER-Effekte nicht durch eine höhere Verdünnung der zu prüfenden Lösung neutralisiert werden. Zudem handelt es sich um ein zeit- und temperaturabhängiges Phänomen.

So kann bei künstlich beaufschlagten Probenlösungen direkt nach Zugabe der Endotoxine noch eine gültige Endotoxinwiederfindung gemäß Arzneibuchvorgabe von 50 bis 200 Prozent ermittelt werden. Diese kann jedoch schon innerhalb weniger Stunden auf einen Wert deutlich unterhalb von 50 Prozent sinken.

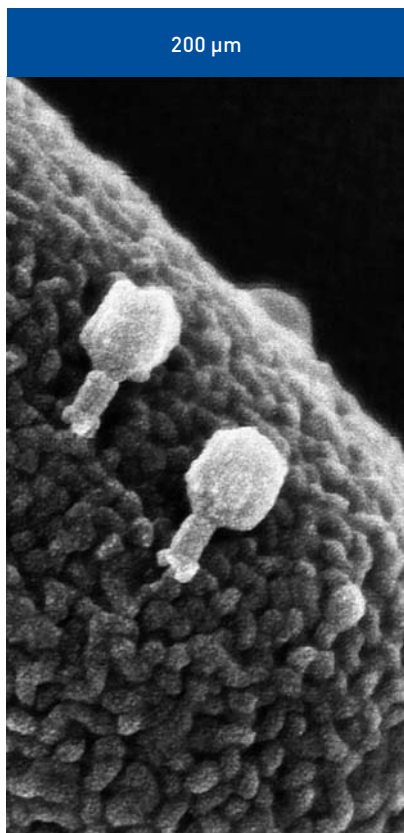
Hausinterne Studien der Labor L+S AG zur weiteren Charakterisierung von LER-Effekten belegen, dass das EndoLISA®-Testsystem der Firma Hyglos im Vergleich zum klassischen LAL-Test geringere Testinterferenzen gegenüber organischen Lösungsmitteln und bivalenten Ionen aufweist.

Abbildung 2: Dieses Schema zeigt, wie die Demaskierung von Endotoxin durch Endo-RS® funktioniert.



Ansatz-Nr.	Komp. A	Komp. B	Komp. C	Komp. D1	Komp. D2	Komp. E	Spike [%]
Gruppe 1	1	150 µl	-	-	-	100 µl (unverdünnt)	22,9
	2	150 µl	-	-	-	100 µl (verdünnt 1:10)	13,4
	3	150 µl	-	-	-	100 µl (verdünnt 1:100)	1,1
Gruppe 2	4	150 µl	-	100 µl	-	100 µl (unverdünnt)	21,9
	5	150 µl	-	100 µl	-	100 µl (verdünnt 1:10)	7,9
	6	150 µl	-	100 µl	-	100 µl (verdünnt 1:100)	0,8
Gruppe 3	7	150 µl	-	100 µl	100 µl	100 µl (unverdünnt)	112,2
	8	150 µl	-	100 µl	100 µl	100 µl (verdünnt 1:10)	2,3
	9	150 µl	-	100 µl	100 µl	100 µl (verdünnt 1:100)	0,9
Gruppe 4	10	150 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl (unverdünnt)	2,4
	11	150 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl (verdünnt 1:10)	23,1
	12	150 µl	100 µl	100 µl	-	100 µl (verdünnt 1:100)	18,5
Maskierungs-kontrolle	13	-	-	-	-	-	0,5
Endotoxin Kontrolle	14	-	-	-	-	-	100,0

Abbildung 3:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit T4-Bakteriophagen infizierten Bakterienzelle.
Quelle: www.hyglos.de



Die Prüfung höherer Chemikalienkonzentrationen ohne solche Interferenzen bietet neue Möglichkeiten der Probenvorbereitung. Hierzu zählt u. a. auch der Einsatz sogenannter Demaskierungskits, durch die Endotoxinmaskierungseffekte aufgehoben werden können.

Der EndoRS®-Demaskierungskit von Hyglos für LER-Effekte durch nichtionische Tenside in proteinhaltigen Arzneimittel-lösungen mit Chelatoren ermöglichte in ersten Versuchen Endotoxinwiederfindungsraten von 95 bis 112 Prozent – und das bei einer zuvor vollständig maskierten Proteintlösung (Humanes Serum Albumin 5%, DMSO 7,5% in Composol®).

Der EndoRS®-Demaskierungskit besteht aus mehreren, aufeinander abgestimmten Reagenzien und beinhaltet zudem einen Endotoxinstandard ohne Hilfsstoffe und Stabilisatoren. Die Reagenzien dienen u. a. der Aufhebung von intermolekularen Bindungen (z. B. zwischen Endotoxin und Protein), der Neutralisation von Detergenzien sowie der Rekonfiguration von LPS-Strukturen.

Die Wahl eines Endotoxinstandards ohne Hilfsstoffe und Stabilisatoren beschleunigt die Entstehung von Maskierungseffekten. Der Einfluss der Testkitkomponenten auf die artifiziell beaufschlagte Prüflösung mit bekanntem LER-Effekt wird im Rahmen eines definierten Screeningverfahrens geprüft. Anschließend erfolgt eine Optimierung der Probenvorbereitung hinsichtlich einer validen Endotoxinwiederfindungsrate.

Tabella 1:
Ergebnisse des Demaskierungs-screensings unter Verwendung des EndoRS®-Demaskierungskits sowie des EndoLISA®-Testsystems.

Bei Fragen zu diesem speziellen Themenkomplex kontaktieren Sie bitte unsere Ansprechpartner für den Bereich der Endotoxinbestimmung.

 Stefan Gärtner
Abteilungsleiter Prüfung auf Sterilität
Fon: +49 (0)97 08/91 00-4 11
stefan.gaertner@labor-ls.de

 Dr. Maximilian Schlicht
Leiter Geschäftsfeld Prüfungen
Fon: +49 (0)97 08/91 00-4 35
maximilian.schlicht@labor-ls.de

 Dr. Enrico Barth
Abteilungsleiter Prüfung auf Bakterien-Endotoxine
Fon: +49 (0)97 08/91 00-4 62
enrico.barth@labor-ls.de

Wenn Sie zu diesen komplexen und umfangreichen Themen Fragen haben, stehen Ihnen Herr Dr. Maximilian Schlicht und Herr Dr. Enrico Barth gerne beratend zur Seite. Ein Anruf oder eine E-Mail genügt.



Dr. Maximilian Schlicht
Leiter Geschäftsfeld Prüfungen
Fon: +49 (0)97 08/91 00-435
maximilian.schlicht@labor-ls.de



Dr. Enrico Barth
Abteilungsleiter Prüfung auf
Bakterien-Endotoxine
Fon: +49 (0)97 08/91 00-462
enrico.barth@labor-ls.de



Kontaktieren Sie uns!

Haben Sie Interesse an Informationen zu unseren aktuellen Themen oder möchten Sie einen Beratungstermin mit uns vereinbaren? Füllen Sie bitte das Kontaktformular aus und senden es uns per Fax oder E-Mail zu – wir reagieren umgehend!

Mit mehr als 28 Jahren Unternehmensgeschichte und mehr als 420 Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen gehört die Labor L+S AG zu den weltweit führenden Anbietern von Qualitätskontrollen in der Pharmaindustrie, bei Kosmetik- und Medizinprodukten.

So liegt der Anteil deutscher Pharmaunternehmen, die bei der Labor L+S AG Laborleistungen beziehen, bei über siebenzig Prozent.



Fax an: +49 97 08/91 00-8 90
E-Mail: service@labor-ls.de

Ich interessiere mich für folgende Themen:

- Firmenpräsentation
- (Mikro-)biologische Prüfungen
- Betriebshygiene (QVPlus®)
- Chemisch-physikalische Prüfungen
- Spezielle Prüfungen

Vereinbaren Sie einen Besuchstermin mit uns:

Firma

Vorname, Name

Straße, Hausnummer

PLZ, Ort

Land

Telefon

Fax

E-Mail

Nachdruck nur mit schriftlicher Genehmigung des Herausgebers. Dieses gilt auch für die Aufnahme in elektronische Datenbanken und die Verbreitung über digitale Medien.

Redaktion: Dr. Maximilian Schlicht, Geschäftsfeldleitung (verantwortlich).

Haftungsausschluss: Trotz sorgfältiger Kontrolle übernehmen wir keine Haftung für Inhalte, Fehler oder Auslassungen sowie für externe Links.

Für den Inhalt auf den angegebenen Internetseiten sind ausschließlich deren Betreiber verantwortlich.

Diese Zeitschrift stellt keinen anwaltlichen Rechtsrat dar und ersetzt keine auf den Einzelfall bezogene anwaltliche Beratung.

Labor L+S AG

Biologische Prüfungen
Mangelsfeld 4, 5, 6
97708 Bad Bocklet-Großenbrach

Fon: +49 97 08/91 00-435
Fax: +49 97 08/91 00-36

E-Mail: service@labor-ls.de
Web: www.labor-ls.de

