

// **Anforderungen** an die
Sterilproduktion - **Depyrogenisierung**
bei **Primärpackmitteln.** ///



BAUSCH+STRÖBEL

Entfernung und Nachweis des Pyrogens Endotoxin

Bei der Produktion von sterilen Arzneimitteln werden hohe Ansprüche an die Reinheit gestellt. Insbesondere Biopharmazeutika, die in Fermentations- und Zellkulturprozessen gewonnen werden und nicht entsprechend der behördlichen Vorgaben im Endbehältnis sterilisiert werden können, müssen aus absolut reinen Bestandteilen der Zubereitung unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden (European Commission 25.11.2008; U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 2004).

Eine besonders komplizierte Gruppe an Verunreinigungen bilden Pyrogene, welche unweigerlich Teil eines Fermentations- und Zellkulturprozesses sind, gleichzeitig aber bei einer Verabreichung in die Blutbahn zum Teil sehr starke, unerwünschte Arzneimittelwirkungen verursachen.

Pyrogene sind chemisch sehr heterogene Stoffe, die nach Eindringen in die Blutbahn eine Immunreaktion beim Menschen auslösen und unter anderem Fieber verursachen. Sie sind entweder endogen (IL-1, IL-6 und TNF-alpha) oder exogen (LPS (Endotoxin) / Partikel aus Materialabrieb). Endotoxine können als eine Subklasse der Pyrogene angesehen werden und sind eigentlich ein Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien. Sie zählen als häufigste Quelle für Pyrogenität und gleichzeitig auch als stärkste Pyrogene.





Bei der Herstellung von Biopharmazeutika gilt es also die Menge vorhandener Pyrogene und speziell Endotoxine zu bestimmen und zu minimieren. Hierzu gibt es unterschiedliche Möglichkeiten:

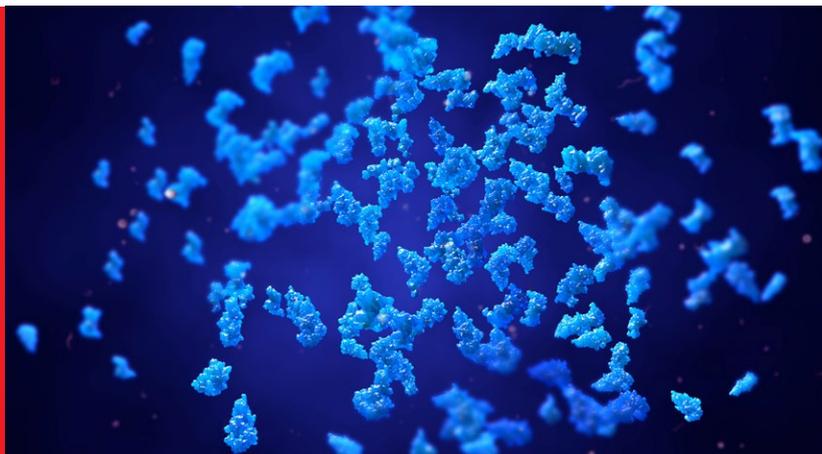
Klassischer Nachweis von Pyrogenen

Der Nachweis von Pyrogenen sowie der Prozess der Depyrogenisierung sind in den USP Kapiteln <151> Pyrogen Test und <1228> Depyrogenation (The United States Pharmacopeial Convention; The United States Pharmacopeial Convention) beschrieben. USP <151>, der Kaninchen-Pyrogentest (RPT), erfordert eine Injektion der Testsubstanz in Kaninchen, gefolgt von einer Messung des Anstiegs derer Körpertemperatur. Der Nachweis von Endotoxin mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test (nach USP <85>/ USP <1085> oder dem europäischen Äquivalent Ph. Eur. 8, 2.6.14 Prüfung auf Bakterien-Endotoxine) gilt in der Branche als Goldstandard für den spezifischen Endotoxinnachweis (The United States Pharmacopeial Convention 01 Dec., 2012, 2018_Entwurf).



Die Nutzung von Versuchstieren (USP <151>) wird ethisch immer kritischer hinterfragt, aber auch die Verwendung eines Reagenzes aus dem Blut der bedrohten Spezies der Pfeilschwanzkrebse (USP <85>/ USP <1085>) ist kritisch zu betrachten. Immerhin besteht im europäischen Raum eine mögliche Alternative zur Verwendung des LA-Lysats: Der rekombinante Faktor C Test (entsprechend Ph. Eur.- 2.6.32 Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C). Hinzu kommen Schwierigkeiten mit der Robustheit und Reproduzierbarkeit des LAL-Assay. Eine besonders große Herausforderung bilden dabei sogenannte Maskierungseffekte von Bestandteilen in Arzneimitteln, welche die Struktur des Endotoxins in eine für den LAL-Assay nicht nachweisbare Form ändern (Low Endotoxin Recovery-LER, Reich 2016). Das Beherrschen solcher Effekte ist hoch kritisch und alles andere als trivial.

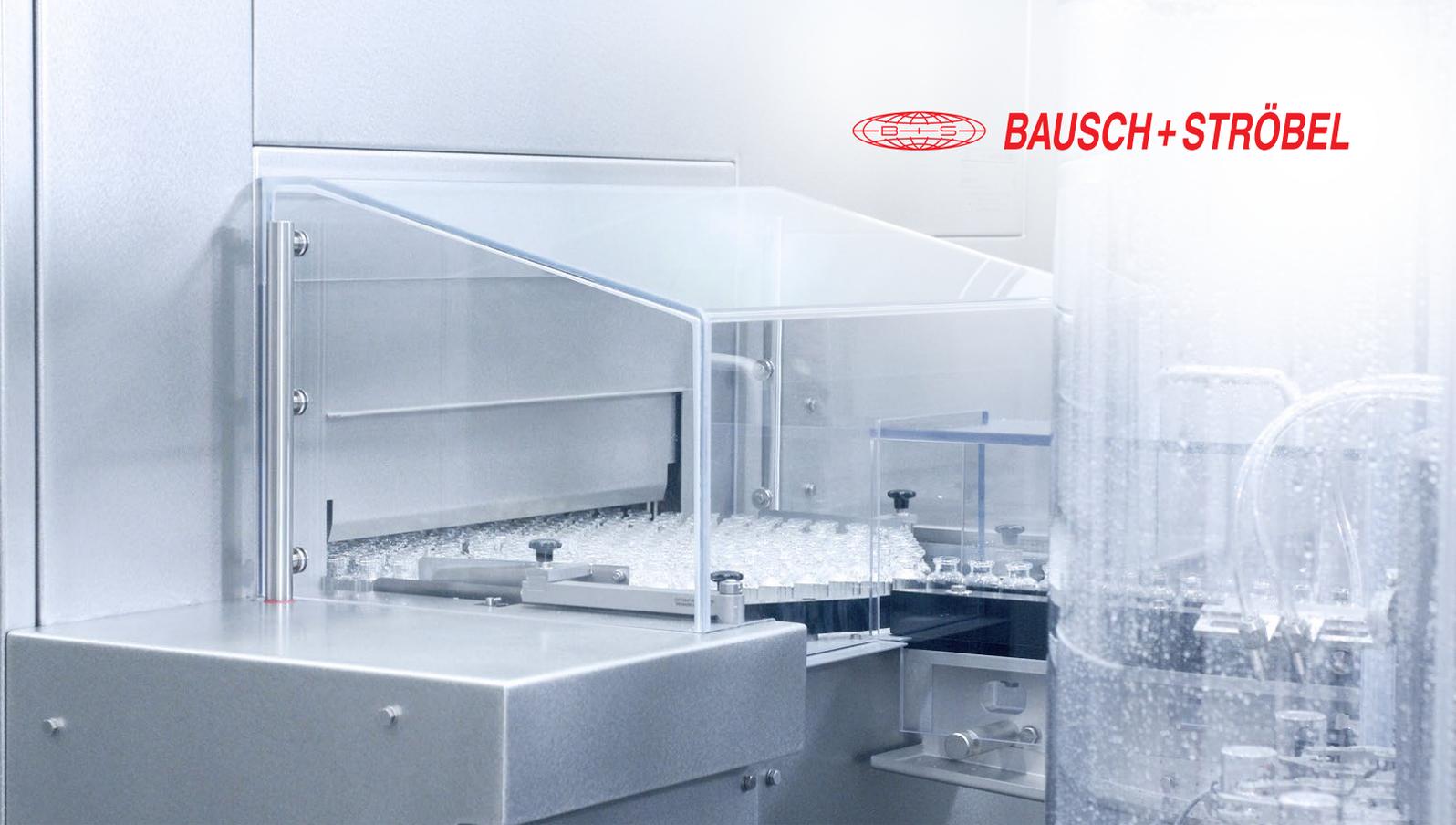
Eine besonders große
Herausforderung bilden
dabei sogenannte
Maskierungseffekte von
Bestandteilen in
Arzneimitteln.



Die offensichtlichste und größte Einschränkung der Tests (LAL und rekombinanter Faktor C) dürfte jedoch darin liegen, dass es neben den Endotoxinen viele weitere Klassen an Pyrogenen gibt und dass der LAL-Test im Vergleich zum RPT keinen Aufschluss über die vorhandenen Mengen dieser weiteren Nicht-Endotoxin Pyrogenen (NEP) gibt.

Eine echte Alternative zum RPT bietet daher der Monozyten-Aktivierungstest (MAT). Der große Vorteil des MATs ist der zusätzliche Nachweis von NEPs. Dazu zählen unter anderem Peptidoglycane, Flagellin oder Lipoteichonsäure. Diese In-vitro-Methode beruht auf der immunologischen Reaktion von Monozyten, die beim Kontakt mit pyrogenen Substanzen, wie Endotoxin oder Peptidoglycan, pro-inflammatorische Cytokine (z.B. IL-6) freisetzen. Diese endogenen Stoffe können anschließend mit verschiedenen Analysesystemen nachgewiesen werden, wie dem „Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA).





Pyrogene und pharmazeutischer Anlagenbau

Als starker Partner unserer Kunden sind wir uns bewusst, dass die zuverlässige Depyrogenisierung des Primärpackmittels kritisch für den biopharmazeutischen Herstellungsprozess ist. Daher setzen wir auf eine Zusammenarbeit mit der Weltspitze im Pyrogen- und Endotoxinnachweis. Zusammen mit Micro-coat Biotechnologie GmbH konnten wir nachweisen, zu welchem Grad eine Depyrogenisierung des Packmittels innerhalb verschiedener Prozessarbeitsschritte wie Ultraschallbehandlung, Waschen und Hitzebehandlung erfolgen kann. Die Ergebnisse zeigen: Eine erfolgreiche und sichere Depyrogenisierung findet statt, wenn das Primärpackmittel mit trockener Hitze sterilisiert wird. Somit ist der alleinige Waschprozess für die erfolgreiche 3-log Reduktion nicht ausreichend. Der Einsatz von Ultraschall beim Reinigen der Primärpackmittel kann unterstützend eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

März 2022

European Commission (25.11.2008): Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use- Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version).

Online verfügbar unter https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf, zuletzt geprüft am 10.11.2021.

The United States Pharmacopeial Convention (2018_Entwurf): <1085> Guidelines on Endotoxins Testing.

The United States Pharmacopeial Convention: <1228> Depyrogenation.

The United States Pharmacopeial Convention: <151> Pyrogen Test. Online verfügbar unter http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c151.html, zuletzt geprüft am 10.11.2021.

The United States Pharmacopeial Convention (01 Dec., 2012): <85> Bacterial Endotoxins Test.

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2004): Guidance for Industry- Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing- Current Good Manufacturing Practice. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/media/71026/download>, zuletzt geprüft am 10.11.2021.



Noch Fragen? Reden Sie mit uns!

Wenn Sie weitere Informationen zu diesem Thema wünschen, können Sie uns gerne kontaktieren.