



# Ablösung des Pyrogentests als Chargenkontrollprüfung bei den Biologika Aprotinin und Urokinase

Karl-Heinz Diehl

Aventis Pharma Deutschland GmbH, D-Marburg

## Zusammenfassung

*In der Pharmeuropa Vol. 10, No. 4 wurde im Dezember 1998 ein Aufruf der Europäischen Arzneibuchkommission zum Ersatz des Pyrogentests durch den Limulustest bei insgesamt 10 Biologika veröffentlicht. Darunter fielen auch die in unseren Handelspräparaten Antagosan® und Actosolv® enthaltenen Wirkstoffe Aprotinin und Urokinase, für die wir nach erfolgreicher Validierung des Limulustests Endotoxin-Grenzkonzentrationen berechneten und an das European Department for Quality of Medicines (EDQM) weiter leiteten. Wir erwarten nicht zuletzt aufgrund der von uns eingereichten Daten zukünftig eine Ablösung des Pyrogentests durch den Limulustest als Qualitätskontrolltest zur Prüfung von Aprotinin- und Urokinasepräparaten auf Freisein von fiebererzeugenden Substanzen. Dies führt zur Einsparung der derzeit noch für die Prüfung der betreffenden Präparate im Pyrogentest eingesetzten Kaninchen.*

*Summary: Replacement of the Pyrogen-Test as Batch Control Test for the Biological Substances Aprotinin and Urokinase In the Pharmeuropa Vol. 10, No. 4, December 1998, the European Pharmacopoeia Commission published an appeal to replace the pyrogen test by the limulus test for a total of 10 biological substances. These substances included the active ingredients aprotinin and urokinase, contained in our sales products Antagosan® and Actosolv®. After successful validation of the limulus test, we calculated endotoxin limit concentrations for these and submitted these to the European Department for Quality of Medicines (EDQM). We expect - not least on the basis of the data submitted by ourselves - that the pyrogen test will be replaced in future as a quality control test by the limulus test in testing aprotinin and urokinase compounds for the presence of pyrogenic substances. This leads to a reduction in the number of rabbits used as opposed to the current pyrogen test for testing the stated compounds.*

*Keywords: 3R, replacement, Aprotinin, Urokinase, pyrogen test, limulus test, validation*

## 1 Einleitung

Zum Ausschluss einer Belastung mit Pyrogenen müssen viele am Menschen par-enteral angewendete Arzneimittel im Rahmen der Chargenkontrolle auf das Freisein von fiebererzeugenden Stoffen im Pyrogentest am Kaninchen geprüft werden.

In der Pharmeuropa Vol. 10, No. 4 wurde im Dezember 1998 ein Aufruf der Europäischen Arzneibuchkommission zum Ersatz dieses Tests durch den Limulustest veröffentlicht. Dabei erging an Experten und Hersteller von insgesamt 10 Biologika die Aufforderung nach Bereitstellung von Daten zur Ablösung des Pyrogentests durch den Limulustest in den entsprechenden Monographien. Ziel ist eine Reduktion des Einsatzes von Tieren bei in Arzneibüchern geforderten Prüfungen. Die Bereitstellung von Daten einschließlich Stellungnahmen sollte bis zum 31. März

1999 an EDQM erfolgt sein. Von besonderem Interesse waren Informationen zu folgenden Punkten:

- ▶ Angabe/Vorschlag der Limulustestmethode (Methoden A, B, C, D, E, gemäß Kapitel 2.6.14. des Europäischen Arzneibuchs)
- ▶ Angaben zu Problemen und Einschränkungen bei der Anwendung der gewählten Methode
- ▶ Validierungsdaten für den Ersatz des Limulustests anstelle des Pyrogentests
- ▶ Unterlagen über die Akzeptanz des Limulustests anstelle des Pyrogentests durch (Zulassungs-) Behörden
- ▶ Vorschläge und Daten zur Festlegung von Grenzwerten

Der Aufruf betraf die in unseren Handelspräparaten Antagosan®, Actosolv® und Streptase® enthaltenen Wirkstoffe Aprotinin, Urokinase und Streptokinase. Als

Reaktion darauf erfolgte die Erhebung von Daten zur Validierung des Limulustests bei Aprotinin und Urokinase, die zusammen mit bereits vorhandenen Daten zur Streptokinase an EDQM weiter geleitet wurden.

## 2 Material und Methoden

Bei Aprotinin (Antagosan®), einem Antifibrinolytikum und Antihämorrhagikum, handelt es sich um ein aus Rinderlungen gewonnenes und aus 58 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Urokinase (Actosolv®) ist ein plasminogenaktivierendes Enzym, welches als Polypeptid aus menschlichem Urin gewonnen und als Fibrinolytikum therapeutisch eingesetzt wird. Für beide Substanzen ist der Pyrogentest als Chargenkontrollprüfung auf Freisein von fiebererzeugenden Substanzen vorgeschrieben (Europäisches Arzneibuch, 1997 und Nachtrag 2000). Aprotinin wurde in

einer Dosis von 30.000 Kallikrein inaktivierenden Einheiten (KIE's) pro Kilogramm Körpergewicht geprüft, bei Urokinase betrug die Dosis 50.000 internationale Einheiten (I.U.) pro Kilogramm Körpergewicht. Von beiden Substanzen wurde die zu Validierungszwecken erforderliche Anzahl von 3 Chargen eingesetzt. Die Prüfung erfolgt an 3 gesunden, ausgewachsenen, unter klimatisierten Bedingungen einzeln gehaltenen Kaninchen mit einem Mindestgewicht von 1,5 kg Körpergewicht. 1-3 Tage vor dem Test wird die Eignung der für den Test vorgesehenen Tiere überprüft. Dazu erhalten die Tiere unter Testbedingungen 10 ml physiologische Kochsalzlösung pro Kilogramm Körpergewicht über die Ohrvene verabreicht. Mit einem Anstieg von mehr als 0,6°C darauf reagierende Tiere scheidet für die eigentliche Prüfung aus. Damit wird der Einsatz von bereits auf das Testprotokoll extrem empfindlich reagierenden Tieren, welche in Wahrheit nicht vorhandene Pyrogene fälschlicherweise anzeigen könnten, bei der Prüfung ausgeschlossen. Dort erhielten zuvor unter Testbedingungen über mindestens 1 Stunde konditionierte Tiere die oben genannten Dosierungen in einem Applikationsvolumen von 3 (Antagosan®) bzw. 1 (Actosolv®) ml pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht, worauf sich die Aufzeichnung der Körpertemperatur der Kaninchen für 3 Stunden anschloss. Eine Substanz hat den Pyrogentest gemäß den im Europäischen Arzneibuch genannten Vorgaben bestanden, wenn die Summe des bei den 3 eingesetzten Kaninchen registrierten Temperaturanstiegs nicht mehr als 1,15°C beträgt. Liegt die Temperatur über 1,15°C, aber auch nicht höher als 2,65°C, ist eine Wiederholung des Tests möglich, maximal bis zum Einsatz von 12 Kaninchen (Europäisches Arzneibuch, 1997).

Parallel zum Pyrogentest erfolgte die Prüfung der Aprotinin- und Urokinasechargen in dem zu dessen Ablösung vorgesehenen Limulustest (Europäisches Arzneibuch, Nachtrag 2000). Von den im Europäischen Arzneibuch akzeptierten 5 Methoden kam der Gel Clot Limit Test (Methode A) zum Einsatz. Der Gehalt einer Substanz an Endotoxinen, der quantitativ und qualitativ wichtigsten Gruppe der fiebererzeugenden Substanzen, wird in diesem Test anhand der Stärke der Reaktion

\* Aktives Lysat kann auch aus eng verwandten Spezies gewonnen werden, wie denen der Gattung *Tachypleus*.

mit einem aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*\* hergestellten Lysats bei einer Inkubationszeit von 20-60 Minuten und einer Temperatur von 37°C bestimmt. Im Falle einer positiven Reaktion, d.h. bei der Anwesenheit nachweisbarer Endotoxinmengen, tritt eine Gelbildung bei dem ursprünglich flüssigen Limuluslysate ein. Ansonsten behält das Lysat seinen flüssigen Ausgangszustand bei. Die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Reaktion ist durch Drehen der Probenröhrchen um 180° am Ende der Inkubationszeit leicht zu treffen. Die exakte Quantifizierung des Endotoxingehalts von Proben erfolgt über Verdünnungsreihen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Pyrogentest

Alle Aprotinin- und Urokinasechargen lagen in der Summe der bei den einzelnen Tieren gemessenen Temperaturerhöhungen unter dem zur Klassifizierung einer Probe als pyrogenfrei maximal zulässigen Wert von 1,15°C und sind somit als pyrogenfrei zu bewerten (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Ergebnisse im Pyrogentest (angegeben ist die während des Tests gemessene Temperaturerhöhung)**

Präparat	Dosis .../kg Körpergewicht	Charge-Nr.1 °C, Summe (Einzelwerte)	Charge-Nr.2 °C, Summe (Einzelwerte)	Charge-Nr.3 °C, Summe (Einzelwerte)	Bewertung
Antagosan®	30.000 KIE	0,64 (0,19; 0,26; 0,19)	0,27 (0,10; 0,00; 0,17)	1,02 (0,43; 0,14; 0,45)	Pyrogenfrei
Actosolv®	50.000 I.U.	0,27 (0,08; 0,04; 0,15)	0,34 (0,11; 0,14; 0,09)	0,82 (0,14; 0,17; 0,51)	Pyrogenfrei

#### 3.2 Limulustest

Die Prüfung im Limulustest ergab bei keiner Charge eine messbare Endotoxinkonzentration. Sie lag somit unter der Nachweisgrenze des jeweils eingesetzten Lysats von 0,06 I.U. bzw. 0,25 I.U. Endotoxin/ml bei Aprotinin bzw. Urokinase (siehe Tabellen 2a-b).

Zwischen den getesteten Präparaten und dem Lysat traten weder spezifische noch unspezifische hemmende oder verstärkende Wechselwirkungen auf. Damit ist sichergestellt, dass keine die Analyse in fördernder oder hemmender Weise beeinflussende Störungen vorliegen. Der Limulustest erfüllt damit die in der Europäischen Pharmakopöe genannte Voraussetzung als valide Methode zur Ablösung des Pyrogentests bei Aprotinin und Urokinase.

#### 3.3 Endotoxin Grenzkonzentration (Endotoxin Limit Concentration)

Nach erfolgter Abklärung der Anwendbarkeit des Limulustests bei Aprotinin und Urokinase stellt sich die Frage nach der tolerierbaren Endotoxinhöchstmenge dieser Substanzen in den entsprechenden Arzneimitteln. Dabei versteht es sich von selbst, dass, anders als beim Pyrogentest, Arzneimittel im Limulustest nicht in Dosierungen, die sich von einer am Menschen angewendeten Dosis des betreffenden Präparats ableiten, geprüft werden können. Unter Berücksichtigung der vom Menschen tolerierten Endotoxinmengen und unter Einbeziehung der am Menschen vorgesehenen Höchstdosis eines Präparats, samt der Konzentration des darin enthaltenen Wirkstoffs, wurde eine Formel definiert. Diese erlaubt, die im Limulustest tolerierbare Höchstdosis an Endotoxin in Arzneimitteln und Wirkstoffen abzuleiten. Sie ist als Endotoxin-Grenzkonzentration (ELC = *Endotoxin Limit Concentration*) definiert und wird nach folgender Formel berechnet (Europäisches Arzneibuch, Nachtrag 2000):

$$ELC = \frac{K \cdot c}{M}$$

Dabei sind:

K: die maximale Endotoxin-Dosis in Internationalen Einheiten je Kilogramm Körpermasse je Stunde, die ein Patient in der vorgesehenen Verabreichungsart ohne jegliche unerwünschte Wirkung erhalten kann, im einzelnen bei - i.v. Gabe: 5,0 I.U./kg/Stunde - radioaktiven Arzneimitteln: 2,5 I.U./kg/Stunde - intrathekalen Gabe: 0,2 I.U./kg/Stunde  
c: die Konzentration der Lösung in Anzahl Milligramm oder Internationalen Einheiten des Produktes in Milliliter Lösung; im Falle von Antagosan®: 10.000 KIE/ml, bei Actosolv®: 50.000 I.U./ml  
M: die maximale Dosis des Produktes in Anzahl Milligramm oder Internationalen Einheiten je Kilogramm und je Stunde; im Falle von Antagosan® wur-

**Tabelle 2: Ergebnisse im Limulustest**

**Tabelle 2a:** Antagosan® Reagenz: Limusate 0,06 I.U./ml Ch.-B. 029604  
 LAL-Wasser: Aqua ad injectabilia (Centeon) Ch.-B. 318011  
 Endotoxin: Haemachem Ch.-B. 029806

**Prüfsubstanz: Antagosan® (50 ml) 10.000 KIE/ml, Consistency-Charge-Nr. 1**

	Test	1:1	1:10	1:100	1:1000	Ergebnis I.U./ml	ELC I.U./ml
Prüfsubstanz	1	-	-	-	-	< 0,06	0,77
Prüfsubstanz	2	-	-	-	-	< 0,06	
Prüfsubstanz + 2 λ Spike	1	+	+	+	+	positiv	
Prüfsubstanz + 2 λ Spike	2	+	+	+	+	positiv	
LAL Wasser	1	- (< 0,06 I.U./ml)				negativ	
LAL Wasser	2	- (< 0,06 I.U./ml)				negativ	
LAL Wasser + 2 λ Spike	1	+				positiv	
LAL Wasser + 2 λ Spike	2	+				positiv	

**Charge hat den Test bestanden.**

**Die Prüfung der Chargen 2 und 3 ergab das gleiche Ergebnis.**

**Tabelle 2b:** Actosolv® Reagenz: Limusate 0,25 I.U./ml Ch.-B. 099704  
 LAL-Wasser: Aqua ad injectabilia (Centeon) Ch.-B. 318011  
 Endotoxin: Haemachem Ch.-B. 029806

**Prüfsubstanz: Actosolv® (12 ml) 50.000 I.U./ml, Consistency-Charge-Nr. 1**

	Test	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Ergebnis I.U./ml	ELC I.U./ml	
Prüfsubstanz	1	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0,25	56,8	
Prüfsubstanz	2	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0,25		
Prüfsubstanz + 2 λ Spike	1	+	+	+	+	+	+	+	+	positiv		
Prüfsubstanz + 2 λ Spike	2	+	+	+	+	+	+	+	+	positiv		
LAL Wasser	1	- (< 0,25 I.U./ml)									negativ	
LAL Wasser	2	- (< 0,25 I.U./ml)									negativ	
LAL Wasser + 2 λ Spike	1	+									positiv	
LAL Wasser + 2 λ Spike	2	+									positiv	

**Charge hat den Test bestanden.**

**Die Prüfung der Chargen 2 und 3 ergab das gleiche Ergebnis.**

de von einer Dosis von 65.000 KIE, bei Actosolv® von einer Dosis von 4.400 I.U. ausgegangen.

Die Endotoxin-Grenzkonzentration gibt die Endotoxinkonzentration, die in einem Produkt nicht erreicht werden darf, an. Sie beträgt demnach für:

Antagosan®	Actosolv®
$ELC = \frac{5 \cdot 10.000}{65.000} = 0,77 \text{ I.U./ml}$	$ELC = \frac{5 \cdot 50.000}{4.400} = 56,8 \text{ I.U./ml}$
= 0,14 I.U. Endotoxin/Ph. Eur. Unit Aprotinin	= 0,001 I.U. Endotoxin/I.U. Urokinase

Für beide Präparate gilt, dass der Endotoxingehalt der untersuchten Chargen unter der Endotoxin-Grenzkonzentration liegt.

#### 4 Ausblick

Die für die Wirkstoffe Aprotinin und Urokinase berechneten Endotoxin-Grenzkonzentrationen wurden zusammen mit dem früher für Streptokinase kalkulierten Grenzwert von 0,02 I.U. Endotoxin/100 I.U. Streptokinase als Vorschlag an EDQM weiter geleitet.

Nach der Begutachtung durch Experten des Europäischen Arzneibuchs erfolgte die Publikation der Werte als Vorschlag für die Revision der betreffenden Monographien in der Pharmeuropa Vol. 11, No. 4 im Dezember 1999.

Bei der zu erwartenden Aufnahme des Limulustests in die betreffenden Monographien des Europäischen Arzneibuchs werden die pro Präparat und Charge derzeit noch im Pyrogentest benötigten 3 Kaninchen eingespart.

#### Literatur

- Europäisches Arzneibuch (1997, 2.6.8.). Prüfung auf Pyrogene.  
 Europäisches Arzneibuch (Nachtrag 2000, 2.6.14.). Prüfung auf Bakterien-Endotoxine.  
 N.N. (1998). Replacement of the test for pyrogens by the test for bacterial endotoxins in biologicals. *Pharmeuropa, 10* (4).  
 N.N. (1999). Replacement of the test for pyrogens by the test for bacterial endotoxins in biologicals. *Pharmeuropa, 11* (4).

#### Korrespondenzadresse

Dr. Karl-Heinz Diehl  
 Aventis Pharma Deutschland GmbH  
 ProTox Marburg  
 Postfach 11 40  
 D-35001 Marburg  
 Tel. +49-64-21-39 40 56  
 Fax +49-64-21-39 47 57

