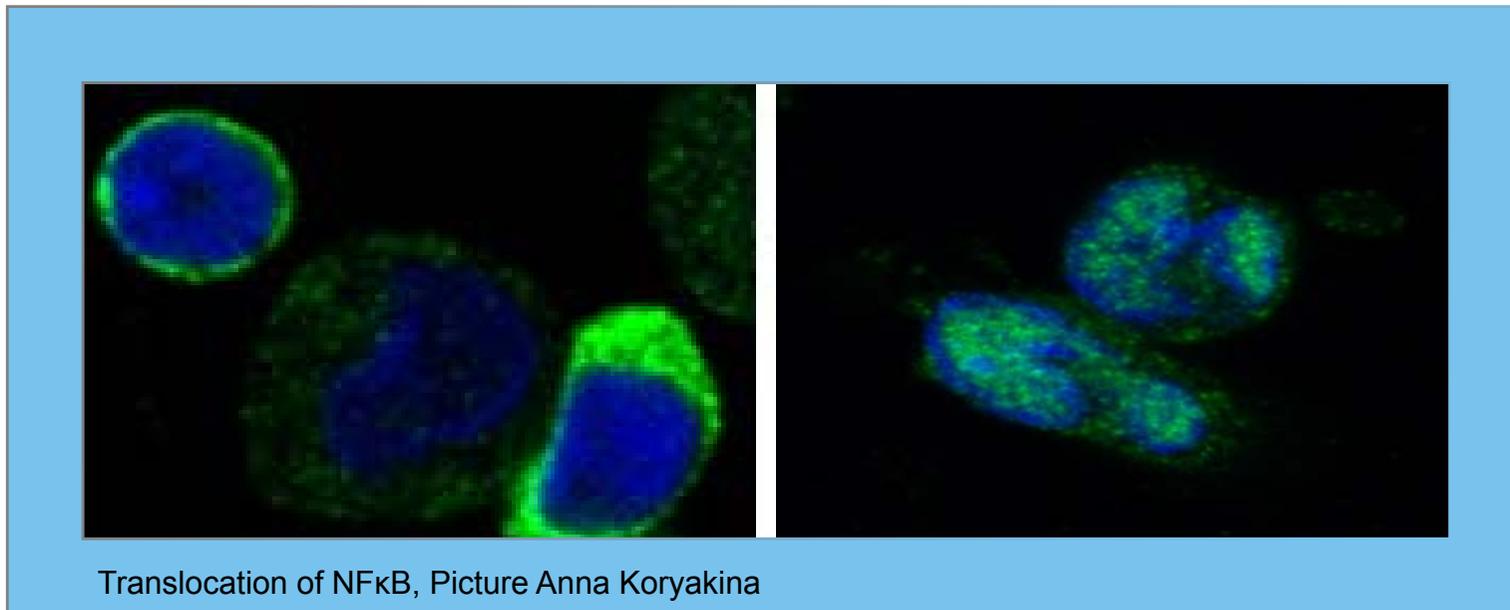


Monocyte Activation Test gemäss EP 2.6.30 sowie eigene Erfahrungen



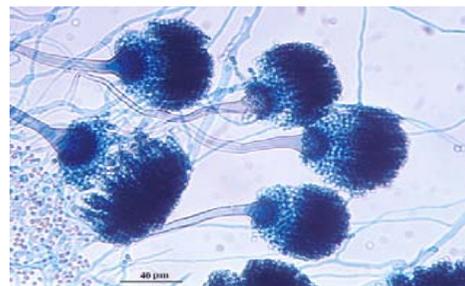
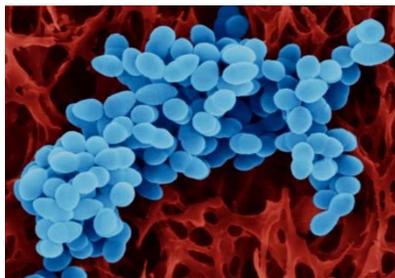
Pyrogene und pro-inflammatorische Kontaminationen

Als Quelle für Pyrogene gelten :

- **Bakterielle Endotoxine** (aus der Zellwand von gramnegativen Bakterien)

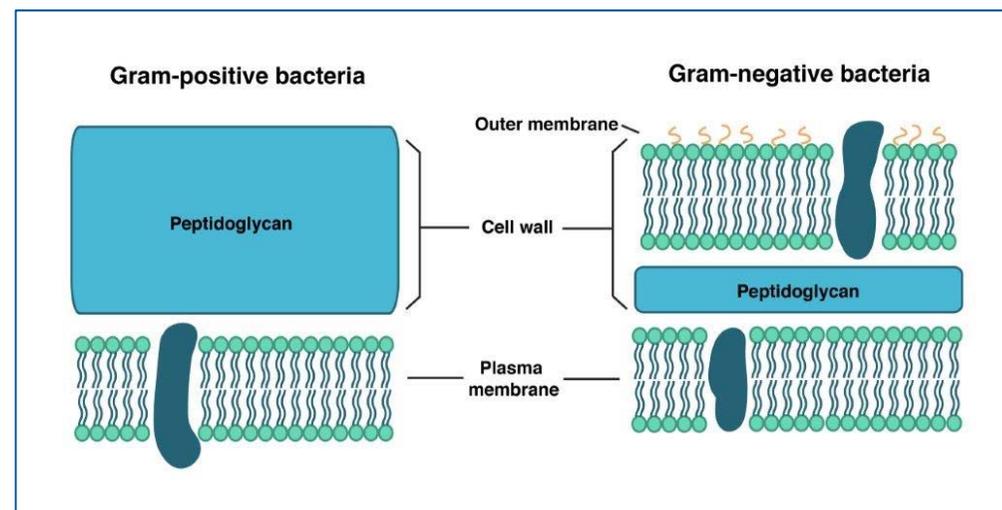


- **Non-endotoxin Pyrogene** (gram positive Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Viren etc.)



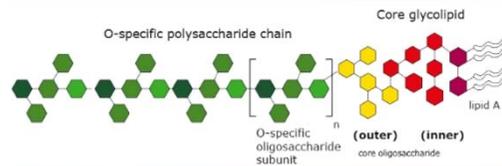
Pyrogene und pro-inflammatorische Kontaminationen

- Als Pyrogene oder pro-inflammatorische Kontaminationen bezeichnet man in der Regel Moleküle oder Fragmente welche Fieber oder lokale Entzündungen (z.B. an der Einstichstelle) verursachen.
- Pro-inflammatorische Kontaminationen können durch Costimulation die pyrogene Wirkung von Endotoxin-Kontaminationen im unterschwelligen Bereich potenzieren.

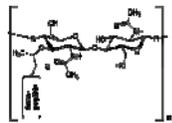


Pyrogene und pro-inflammatorische Kontaminationen

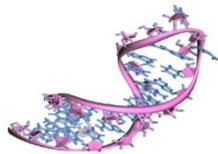
- Diese Moleküle oder Fragmente stammen meistens aus biologischem Material z. B.



LPS



Peptidoglycan



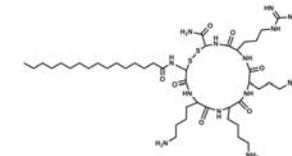
ssRNA



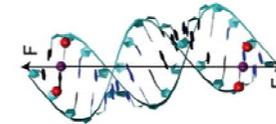
DNA



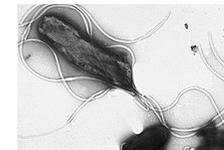
Lipopeptide



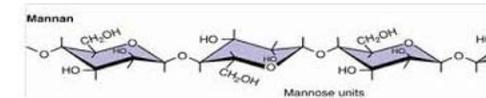
dsRNA



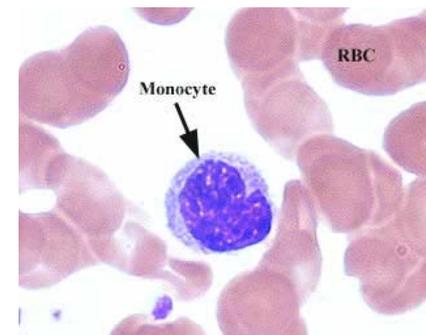
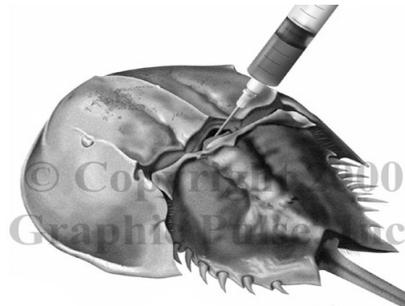
Flagellin



etc



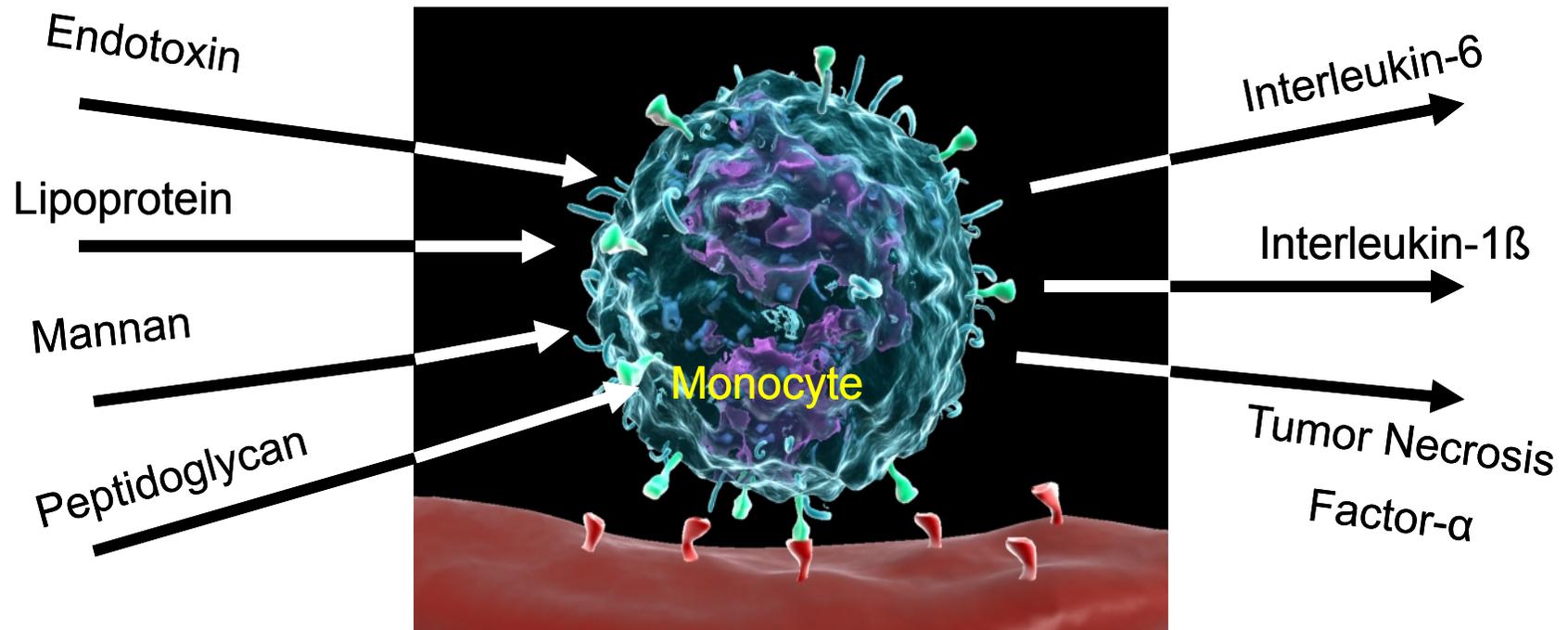
- Kaninchen Pyrogen Test
(EP2.6.8, USP<151>)
- Bacterial Endotoxins Test
(EP2.6.14, USP<85>)
- **The Monocyte Activation Test**
(EP 2.6.30, **nicht in USP**)



Prinzip des Monocyte Activation Test

Stimuli
(as contamination in medicine)

Cytokines
Read out



Der MAT als Pharmacopöe-Methode

Europäische Pharmacopöe



Seit April 2010 steht der MAT In der Pharm. Eur. als Monographie 2.6.30

Es brauchte 7 Jahre Vorbereitung / Diskussion

Etliche Methoden stammen aus der Forschung

2 Methoden stammen aus der Industrie / QC

In 2.6.30 sind sehr viele Varianten berücksichtigt

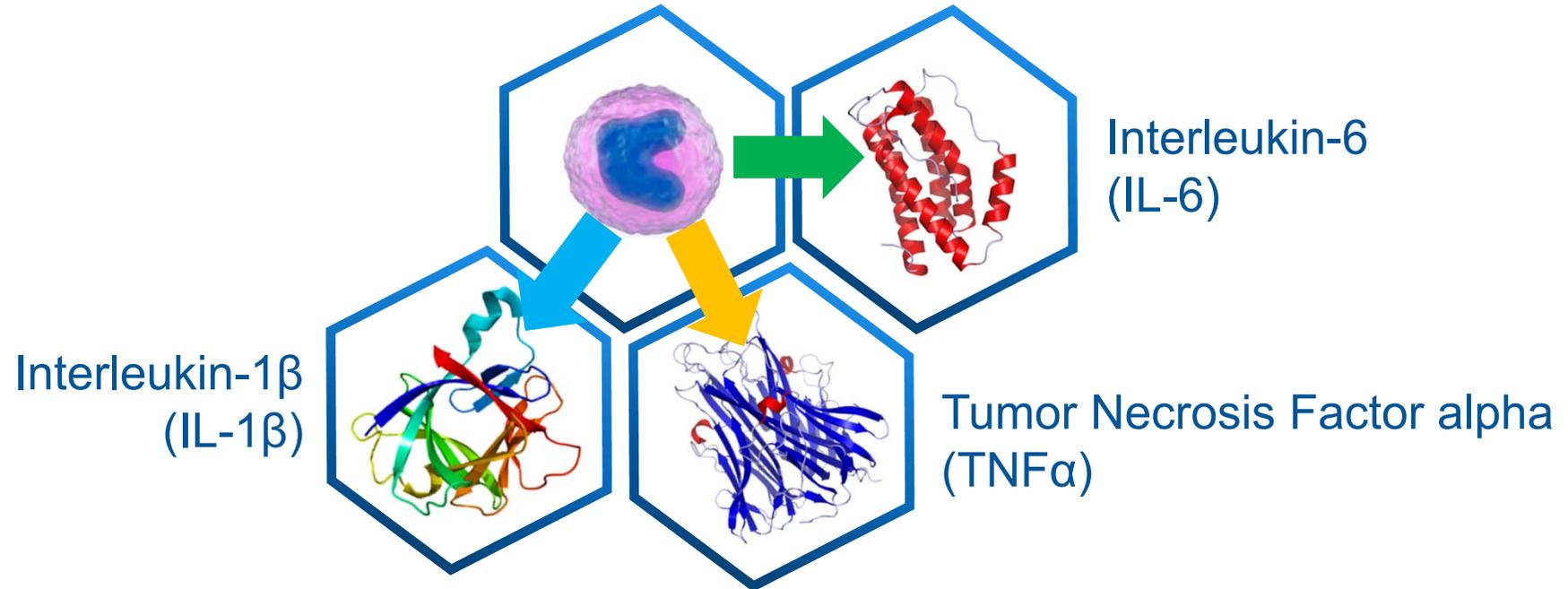
Möglichkeiten für die Durchführung

Methode	Test
A	Quantitativer
B	Semi-quantitativer
C	Reference Lot Comparison

Quellen für Monozyten, welche verwendet werden dürfen

- Humanes Vollblut (frisch oder tiefgefroren oder gepoolt)
- Humane PBMC (frisch oder tiefgefroren oder gepoolt)
- Monocytische Zelllinien (z.B. THP-1, MonoMac6)

Empfohlene Nachweissysteme



CLC

Contaminant Limit Concentration
(entspricht der ELC im BET)

EE

Endotoxin Equivalents (entspricht der Wirkung in
Bezug auf Referenz-Endotoxin)

LOD

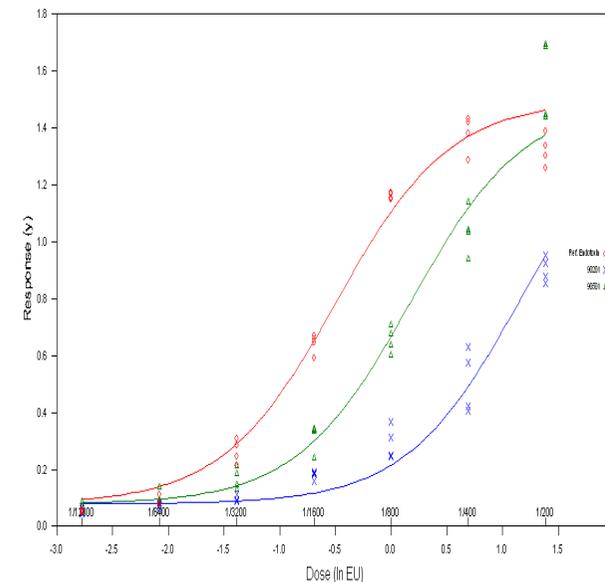
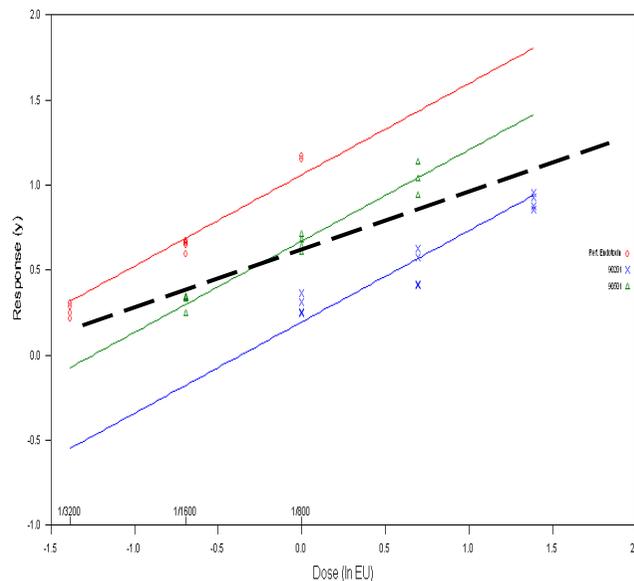
Limit of Detection (entspricht dem Wert, abgetragen auf
der Endotoxin-Standardkurve vom Mittelwert des Blanks
+ 3 Standardabweichungen des Blanks)

- Zwei Akzeptanzkriterien für die Endotoxin-Standardkurve
 1. die Regression muss signifikant sein ($p < 0.01$)
 2. die Linearität muss erfüllt sein ($p < 0.05$)

Methode A

Quantitative Methode

- Gut geeignet für alle Proben, die nicht oder nur schwach kontaminiert sind.
- Bei starker Kontamination, wenn die Probe sich unparallel zur Referenz verdünnt, ist die Kalibration fragwürdig. Dann sollte Methode C angewendet werden.



Problem: Parallelität der Kurven

Methode B

Semi-quantitative Methode oder Limit Test ?

- Es werden 3 Konzentrationen der Prüfsubstanz eingesetzt:
 - Höchste Konzentration ohne Interferenz,
 - 2x die MVD
 - die MVD
- Jede Konzentration wird mit 2 x LOD aufgestockt
- Die Standardpunkte werden mit Referenz-Endotoxin hergestellt:
0.5x LOD, LOD, 2x LOD und 4x LOD

Problem:

**Die LOD ist zu Beginn des Experiments nicht bekannt.
Sie muss geschätzt werden. Bei tiefgefrorenen Zellen kann sie in einem Vorversuch bestimmt werden. Methode B ist quasi ein Limit Test**

Methode C

Reference Lot Comparison

- Die Prüfsubstanz und das Reference Lot werden in 3 Konzentrationen geprüft.
- Das Reference Lot normalisiert die Donor-spezifischen Reaktionen.
- Für die Auswertung wird kein Reference-Endotoxin benötigt. Dafür wird ein Standard für das ausgewählte Cytokine benötigt.

Problem:

Festlegung der Akzeptanz-Kriterien (ideal ist ein Vergleich mit klinischen Daten).

Produktspezifische Validierung (MAT mit PBMC / IL-6)

Am Beispiel von Methode A

1	Qualifizierung der Blutspender
2	Qualifizierung von aufgetauten PBMC (individuell für jeden Donor, mit Endotoxin und mindestens 2 non-endotoxin TLR-Liganden)
3	Test auf Interferenz des Präparates in 2 Konzentrationen mit Endotoxin und mindestens 2 non-endotoxin TLR-Liganden, geprüft mit PBMC von 4 Donoren. Vergleich mit Test ohne Präparat. Zielwert 100% netto Response.
4	Test auf Interferenz der Testsubstanz mit dem Nachweissystem (z.B. ELISA)
5	Statistische Charakterisierung der Referenz-Endotoxin Standardkurven und Berechnung der Limit of Detection
6	Endotoxin Spike Recovery des Präparates in 2 Konzentrationen. Anforderung: 50% - 200%.

Situation des MAT in USA als Pyrogen Test

Kurzer historischer Rückblick

2005 Publikation der Internationalen Validierungsstudie für einen «Pyrogentest» basierend auf humanen Monozyten (Sponsor EU)

Peer Review der Resultate durch das US amerikanische ICCVAM,
Wichtigste Kritikpunkte:

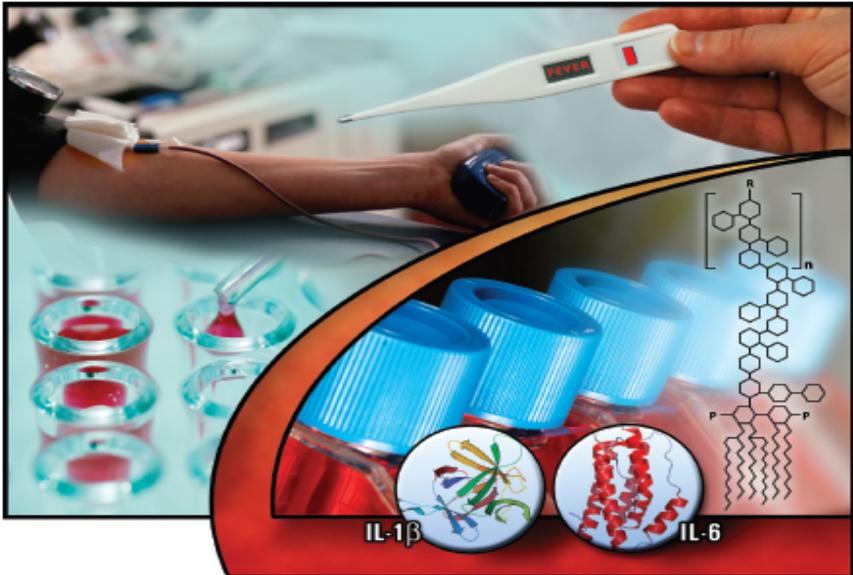
- a) *The lack of **parallel testing** in the in vitro tests and the rabbit pyrogen test.*
- b) *These parallel tests should only be conducted after a vigorous search for a **scientifically sound** non-animal **alternative**.*
- c) *The data and demonstrated performance in terms of their reliability and relevance **does not support** performance standards for **regulatory purposes***
- d) *The test method could be applicable to a wider range of pyrogens (i.e. not only endotoxins) and test materials, provided that it is **adequately validated** for such uses.*

Konsequenz: Der MAT wurde **nicht empfohlen** als Ersatz für den Kaninchen Pyrogentest. Es wurde nicht gezeigt, dass auch non-endotoxin Pyrogene nachgewiesen werden können und dass dieser Nachweis in verschiedenen Kategorien von Prüfmaterial möglich ist.

US Peer Review der Internationalen Studie

ICCVAM 2008

NIH Publication Number 08-6392



IL-1 β **IL-6**

ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT

Validation Status of Five *In Vitro* Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)

Unsere Schlüsse für die Verbesserung des MAT

Ziel ist die generelle Anerkennung des MAT in USA (FDA)

- Zu a) Parallele Tierversuche mit «gespikten» Prüfmustern sind in Europa praktisch verboten wegen der EU Direktive 2010/63. Reale oder ungespikte Produkte können jedoch parallel getestet werden.
Zielwert: keine falsch-positiven Resultate.
- Zu b) Es ist eine wissenschaftlich stimmige in-vitro Referenz-Methode zu etablieren. Nach meinen Erfahrungen hat bisher das System PBMC / IL-6 die besten Ergebnisse bezüglich Behördenakzeptanz gezeigt. Bei allen diesen Tests in verschiedenen Firmen (Schweiz, England, USA) wurden keine «gepoolten» Monozyten verwendet.
- Zu c) Der MAT verlangt eine produkt-spezifische Validierung. Es wird empfohlen den Anweisungen der EP 2.6.30 zu folgen. Zusätzlich wird oft noch «Robustness» verlangt. Einen Quervergleich zum Tierversuch sehen wir aber eher als Ausnahmefall an.
- Zu d) Der MAT, durchgeführt mit PBMC / IL-6 detektiert neben Endotoxinen eine ganze Reihe von non-endotoxin Pyrogenen welche von gram-positiven Bakterien oder von Pilzen stammen (Peptidoglycan, Lipoproteine, Flagellin, Zymosan) können.



Guidance for Industry

Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers

Cross-Validation mit dem Rabbit Pyrogen Test

Gesetzestext und FDA Guidelines

- **21 CFR §610.13b steht: Jedes Los eines Injektionspräparates muss im Kaninchen Pyrogentest geprüft werden**

*Test for pyrogenic substances. Each lot of final containers of any product intended for use by injection shall be tested for pyrogenic substances by **intravenous injection into rabbits** as provided in paragraphs (b) (1) and (2) of this section.*

- **FDA Guideline Pyrogen and Endotoxin Testing: Auf den Kaninchen Pyrogentest kann verzichtet werden wenn eine äquivalente Methode existiert.**

*For certain biological products, 21 CFR 610.13(b) requires **a rabbit pyrogen test**. The requirement in 21 CFR 610.13(b) **may be waived** if a method equivalent to the rabbit pyrogen test is demonstrated...*



FDA wird alternative Methoden, z.B. MAT von Fall zu Fall beurteilen

*The appropriate FDA review division will consider alternative methods, **such as monocyte activation**, on a case-by-case basis.*

- **Präparate müssen auf das Risiko non-endotoxin Pyrogene geprüft werden. Fall non-endotoxin Pyrogene vorhanden sein könnten ist es besser den RPT zu machen**

*For devices and drug materials, firms should assess **the risk** of the presence of **nonendotoxin pyrogens**. If the risk assessment indicates that non-endotoxin pyrogens may be present, it may be more appropriate to use the **rabbit pyrogen test**. (sic!)*

Cross Validation mit MAT

In EP gemäss 5.1.10

- **FDA Guideline Pyrogen and Endotoxin Testing: Eine product-spezifische Validierung ist notwendig für die Anwendung des MAT**



*Product-specific validation is necessary to establish whether a particular test substance or material is appropriate for evaluation of the monocyte activation method. The validation should include, but is not limited to, **interference testing, accurate detection** of pyrogen in individual test samples, and, for devices, ability of test system to provide **direct contact to the monocytes**.*

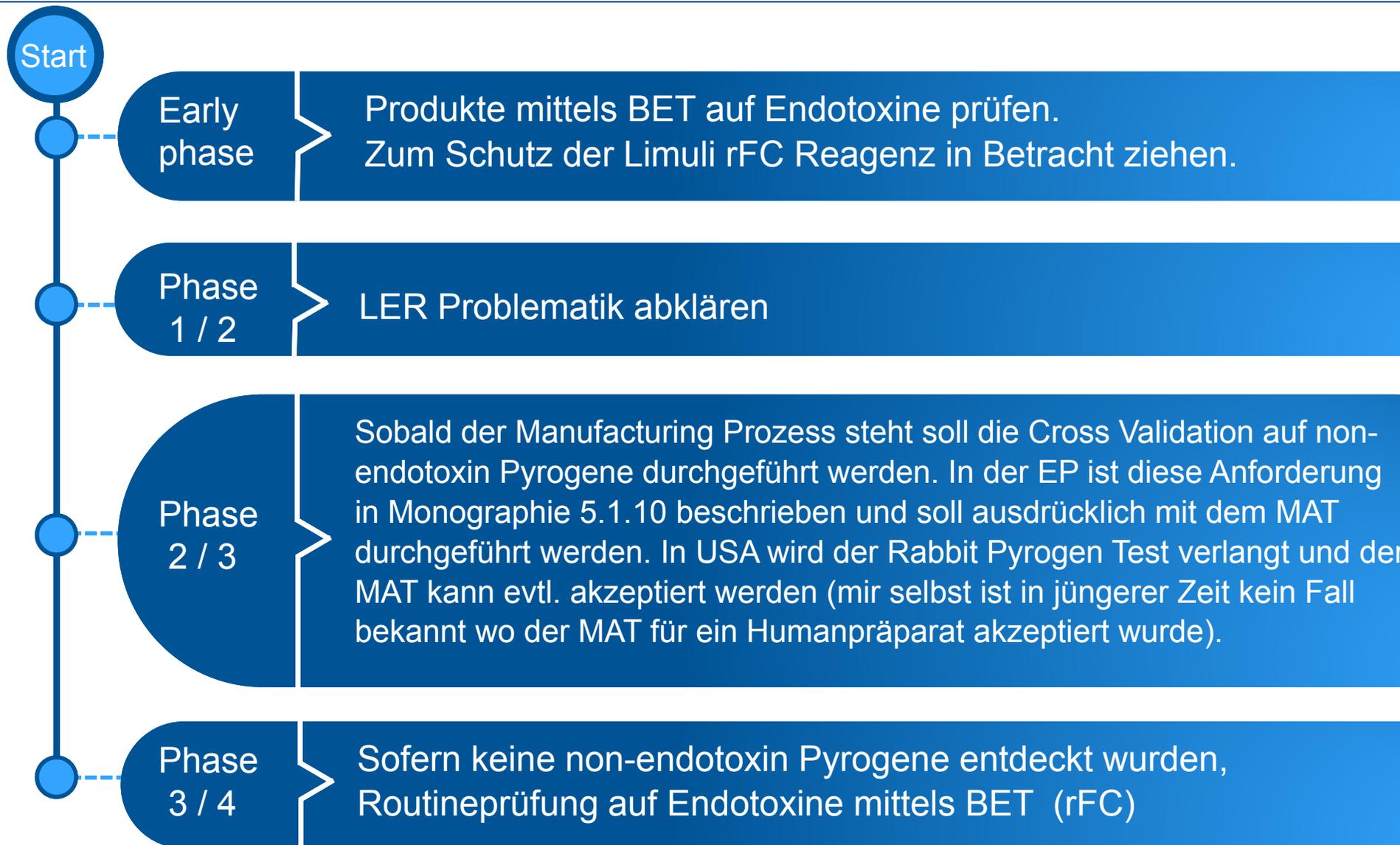
Aus diesen Standpunkten geht hervor, dass die FDA den MAT kennt aber offenbar nur aus dem Report des ICCVAM: Federal Register Nov. 24, 2008.
In der Peer Review (2008) hat der MAT eher schlecht abgeschnitten.

Eigene Erfahrung:

in den Jahren 2013 und 2014 wurden im Rahmen von BLAs product-spezifische Vollvalidierungen mittels MAT an die FDA geschickt. Diese wurden von der FDA nicht akzeptiert. Hingegen wurden die Resultate des Kaninchen Pyrogentests verlangt.

Strategie für Endotoxin- und Pyrogenprüfung

Europäische Sicht





Danke für Ihre Aufmerksamkeit