



Unterschiedliche Ansätze zur Methodvalidierung des Clot Lyse Wirksamkeitstests

Dr. Janet Thode

Lösungsfabrik

Zusammenfassung

Wirksamkeitsbestimmungen (*potency tests*) werden bei der Freigabeanalytik von Arzneimitteln angewandt, um ihre Wirksamkeit zu überprüfen, bevor diese auf den Markt gebracht werden. Ein solcher Wirksamkeitstest ist der Clot Lyse Assay, der die Aktivität des Enzyms Gewebeplasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator, tPA*) anhand seiner Fähigkeit nachweist, künstliche Fibrin-Gerinnsel innerhalb einer bestimmten Zeit zu lysieren. Um zu belegen, dass eine analytische Methode für ihren vorgesehenen Zweck geeignet ist, muss sie vor der späteren routinemäßigen Verwendung validiert werden. Eine solche Validierung kann dabei entsprechend verschiedener Ansätze erfolgen. Im Rahmen ihres Lebenszyklus können Analysemethoden auch weiter optimiert werden.

Einleitung

Jedes Medikament, das von einem Pharmahersteller produziert wird, muss die folgenden grundlegenden Kriterien erfüllen: Es muss wirksam, unbedenklich und von guter Qualität sein. Diese Aspekte werden von den Laboren der Qualitätskontrolle unter Anwendung verschiedener Analyseverfahren kontrolliert. Die dafür eingesetzten Analysemethoden können in Methoden zum Identitätsnachweis, Methoden zur Bestimmung des Gehalts des pharmazeutischen Wirkstoffs, Methoden zur Quantifizierung im Arzneimittel enthaltener Verunreinigungen und in Tests zum Nachweis der Wirksamkeit des Arzneimittels unterteilt werden. Je nachdem woraus das Arzneimittel chemisch gese-

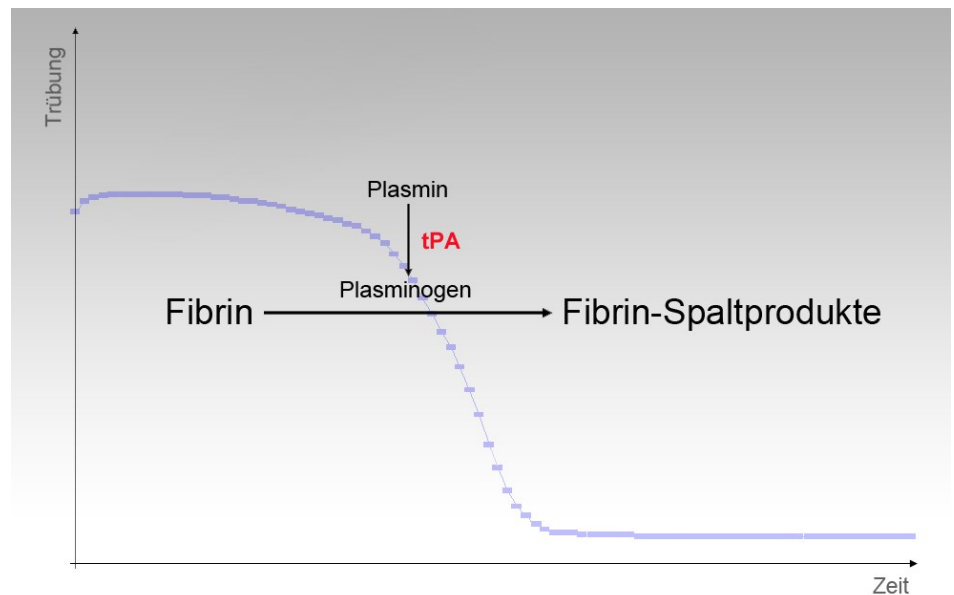


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des Clot Lyse Assays

hen besteht, werden für Wirksamkeitsbestimmungen verschiedene Analysemethoden eingesetzt, wie beispielsweise zellkulturbasierte Tests bei therapeutischen Antikörpern [1]. In diesem Artikel werfen wir einen Blick auf den Clot Lyse Assay als Wirksamkeitsnachweis für das rekombinante enzymatische Arzneimittel tPA.

Der Clot Lyse Assay

Die Serinprotease tPA ist beim Abbau von Blutgerinnseln beteiligt, welche aus Fibrin bestehen. Fibrin kann durch Plasmin in lösliche Produkte gespalten werden. Hier setzt die Wirkung von tPA an, da es das inaktive Plasminogen durch Spaltung in aktives Plasmin umwandelt, welches seinerseits dann das Fibrin angreift. Um die Aktivität von tPA im Clot Lyse Assay nachzuweisen, wird ein künstliches Fibringerinnsel erzeugt. Die Zugabe von tPA bewirkt, dass dieses Gerinnsel aufgelöst wird (siehe Abbildung 1). Dieser Prozess kann

spektrophotometrisch überwacht werden, indem man die Verringerung der Trübung im Laufe der Zeit misst. Der Endpunkt der Wirkung ist definiert als die Zeit, die benötigt wird, um die Absorptionswerte um 50% zu reduzieren. Um die Wirksamkeit einer Arzneimittelprobe zu ermitteln, wird ein Vergleich mit einem parallel mitgeführten Referenzstandard durchgeführt und gemäß des „parallel-line Modells“ [USP <1034>, Ph. Eur. 5.3] ausgewertet.

Dieser Assay wurde vor mehr als 30 Jahren entwickelt [2] und zwischenzeitlich verschiedenen Optimierungen unterworfen.

Welche Validierungsmöglichkeiten gibt es?

Jede Methode, die in einem QC-Labor eingesetzt wird, muss vor ihrem Einsatz zunächst validiert werden, um nachzuweisen, dass sie für ihren Zweck geeignet (*fit-for-purpose*) ist, was bedeutet,

dass sie unter normalen Arbeitsbedingungen zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse generiert.

Für die Validierung von Methoden zur Analyse von Arzneimitteln existieren verschiedene behördliche Richtlinien, wie beispielsweise die von der **FDA herausgegebene Richtlinie** zur Methodenvalidierung für die Industrie, die **ICH Q2(R1)-Richtlinie** sowie entsprechende Arzneibuchkapitel wie z.B. das USP Kapitel <1225>. Am gebräuchlichsten ist die international fast überall anerkannte ICH Q2(R1)-Richtlinie. Gemäß dieser Richtlinie müssen für einen Wirksamkeitstest wie dem Clot Lyse Assay die Methodenvalidierungsparameter Richtigkeit, Wiederholpräzision, interne Laborpräzision, Spezifität, Linearität und Arbeitsbereich überprüft werden. Eine solch klassische Validierung des Clot Lyse Assays wurde z.B. von Huang *et al.* durchgeführt [3].

Da der Clot Lyse Assay ein Bioassay ist, kann jedoch auch ein anderer Ansatz zur Validierung gewählt werden. Für die Validierung biologischer Assays kann das USP-Kapitel <1033> herangezogen werden. Danach muss die interne Laborpräzision (IL), die relative Genauigkeit und die Spezifität untersucht werden. Im Gegensatz zum klassischen ICH Q2(R1)-Ansatz, bei dem die interne Laborpräzision üblicherweise durch die Berechnung der relativen Standardabweichung mehrerer Experimente bestimmt wird, die

von verschiedenen Bedienern an verschiedenen Tagen mit verschiedenen Geräten durchgeführt wurden, empfiehlt das USP-Kapitel <1033> eine Varianzkomponentenanalyse. Diese kann für jedes interessierende Konzentrationslevel (z.B. 3 verschiedene, die den Arbeitsbereich abdecken) mittels ANOVA durchgeführt werden. Die Varianzkomponenten werden wiederum verwendet, um die interne Laborpräzision jedes Levels zu berechnen und der Mittelwert repräsentiert die Gesamt-IL.

Zur Bestimmung der relativen Genauigkeit wird eine sogenannte Verdünnungslinearitätsstudie (*dilutional linearity*) mit einem Referenzstandard bekannter Wirksamkeit durchgeführt. So können beispielsweise 3 Konzentrationen auf ihren individuellen relativen Bias analysiert werden, welcher der Quotient aus gemessener Wirksamkeit gegen theoretische Wirksamkeit in Prozent ist. Darüber hinaus sollte ein Trend im relativen Bias über die Konzentrationen hinweg bewertet werden, was durch Anwendung linearer Regression erfolgen kann. Das Prinzip, die Richtigkeit aus den Experimenten zur Linearität abzuleiten, wird auch bei klassischen ICH Q2(R1) Methodenvalidierungen häufig angewendet. Da im USP-Kapitel <1033> keine Anzahl an Konzentrationen vorgegeben wird, kann ein Minimum von 3 Konzentrationen für die Verdünnungs-

linearitätsstudie verwendet werden, wohingegen von der ICH Q2(R1) mindestens 5 Konzentrationen für klassische Linearitätsexperimente gefordert werden, jedoch keine Anforderung für eine Trendanalyse zum relativen Bias besteht.

Die Spezifität kann bei beiden Ansätzen auf die gleiche Weise untersucht werden, z.B. durch den Nachweis, dass beim Einsatz einer Placebo-Lösung keine Reaktion erfolgt.

Ein anderer Ansatz zur Methodenvalidierung ist die Anwendung eines Genauigkeitsprofils (*accuracy profile method validation*). Dieser Ansatz wurde von der französischen Gesellschaft für pharmazeutische Wissenschaft und Techniken vorgeschlagen [4]. Er basiert auf dem „total error“-Konzept und beinhaltet somit gleichzeitig sowohl die Richtigkeit als auch die Präzision. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Linearität werden verschiedene Methodenleistungsparameter in einer Grafik kombiniert, die als Entscheidungshilfe für die Frage, ob die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist oder nicht, dient. Das Diagramm besteht aus der prozentualen Wiederfindungsrate auf der y-Achse und der Konzentration auf der x-Achse. Zusätzlich werden ein zweiseitiges β -Erwartungstoleranzintervall und Akzeptanzgrenzen eingezeichnet. Das β -Erwartungstoleranzintervall enthält einen Wahrscheinlichkeitsfaktor für zukünftige konforme Ergebnisse und die

Tabelle 1: Mögliche Validierungsansätze für den Clot Lyse Wirksamkeitstest

Ansatz	Validierungsparameter	Pro´s und Con´s
ICH Q2(R1)	Richtigkeit, Wiederholpräzision, interne Laborpräzision, Spezifität, Linearität und Arbeitsbereich	+ behördlich fast überall anerkannt - relativ hoher Aufwand
USP <1033>	interne Laborpräzision, relative Genauigkeit und Spezifität	+ weniger Experimente - unklar, inwieweit dieser Ansatz außerhalb der USA behördlich anerkannt wird
Genauigkeitsprofil	Keine Auftrennung in separate Validierungsparameter, stattdessen Ableitung aus dem Gesamtfehler (also der Summe aus Präzision & Richtigkeit)	+ sehr anschaulich, modern - Behördliche Anerkennung vermutet ¹ , erweiterte Statistik-Kenntnisse notwendig

¹ Die Beteiligung namhafter Pharmaunternehmen in aktuelleren Publikationen lässt auf eine Anwendung in der Industrie schließen, was wiederum den Rückschluss zulässt, dass eine Validierung nach diesem Ansatz behördlich nicht ausgeschlossen ist (was jedoch noch nicht durch eigene Erfahrungen bestätigt werden kann).

Standardabweichung der internen Laborpräzision der zur Validierung durchgeführten Messungen.

Dieser Ansatz wurde oft für Lebensmittel-Analysemethoden angewendet, ist aber auch für Methoden anderer Bereiche wie beispielsweise der Forensik oder der Pharmaindustrie eingesetzt worden [5-7]. Da er auf quantitative Analysemethoden abzielt, ist noch zu klären, inwiefern er auch auf Wirksamkeitstests angewendet werden kann. Entsprechend gibt es derzeit (noch?) keine Publikation über eine Validierung des Clot Lyse Wirksamkeitstests mittels des accuracy profile Ansatzes.

Die Tabelle 1 stellt die drei Validierungsansätze einander kurz gegenüber.

Quo vadis

Da die Methode doch schon etwas in die Jahre gekommen ist, wurden zwischenzeitlich viele Optimierungen in den unterschiedlichen Laboratorien durchgeführt, wie beispielsweise der Einsatz eines automatisierten Gerinnungsanalyse-Systems wie er bei Huang *et al.* beschrieben ist oder die Verwendung von Minitab anstelle von Excel zur Auswertung der Ergebnisse. Des Weiteren könnte die Anwendung von Regelkarten als potenzielle Systemeignungstest (SST)-Kriterien eine interessante moderne Option sein, wenn man an die Empfehlungen der im letzten Winter veröffentlichten **ICH Q12 Richtlinie** denkt. Bezüglich der Validierung könnte die Anwendung des *accuracy profile* Ansatzes auf den Clot Lyse Assay ebenfalls eine interessante und herausfordernde Idee sein, welche jedoch zu einem geringeren Risiko führen würde, dass zukünftige Ergebnisse nicht konform sind.

Fazit

Im analytischen Lebenszyklus werden alte Methoden kontinuierlich verbessert, insbesondere, wenn sie im Rahmen eines Methodentransfers in einem anderen Labor wieder neu zur Anwendung kommen. Dies beinhaltet auch die Anwendung unterschiedlicher Validierungsansätze. Es liegt in der Verantwortung eines jeden Labors, eine Analyse-methode parat zu haben, die dem neuesten Stand der Technik entspricht und die gemäß aktueller Anforderungen validiert wurde, wobei alle potentiell anwendbaren Ansätze berücksichtigt und der für die Methode am besten geeignete ausgewählt werden sollte.

Literatur

- [1] *Rossignol A, Bonnaudet V, Clémenceau B, Vié H, Bretaudeau L, 2017, A high-performance, non-radioactive potency assay for measuring cytotoxicity: A full substitute of the chromium-release assay targeting the regulatory-compliance objective. MABS. 9(3):521-535.*
- [2] *Carlson RH, Garnick RL, Jones AJ, Meunier AM, 1988, The determination of recombinant human tissue-type plasminogen activator activity by turbidimetry using a microcentrifugal analyzer. Anal Biochem. 168(2):428-35*

[3] *Huang L, 2017, Development and implementation of tPA clot lysis activity assay using ACL TOP™ hemeostasis testing system in QC laboratories. Biotechnol Rep (Amst). 16:58-64*

[4] *Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E, 2008, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application. J Pharm Biomed Anal. 48(3):760-71*

[5] *Tighrine A, Pinto E, Melo A, Ferreira IM, Mamou M, Amir Y, 2018, Simultaneous Extraction and Determination of Preservatives and Antioxidants in Juice Samples by an Optimized Microextraction Method Using Central Composite Design and Validated with Accuracy Profile. JAOAC Int. 102(1):208-216*

[6] *Frapas C, Ney J, Coburn M, Augsburg M, Varlet V, 2018, Xenon detection in human blood: Analytical validation by accuracy profile and identification of critical storage parameters. J Forensic Leg Med. 58:14-19*

[7] *De Leersnyder F, Peeters E, Djalabi H, Vanhoorne V, Van Snick B, Hong K, Hammond S, Liu AY, Ziemons E, Vervaet C, De Beer T, 2018, Development and validation of an in-line NIR spectroscopic method for continuous blend potency determination in the feed frame of a tablet press. J Pharm Biomed Anal. 151:274-283*