



25.05.2022

IFG 34/22 Matysik et al.

Chargenprüfung von Comirnaty

Integrität und Identität von mRNA

BNT162b2 ist ein mRNA Impfstoff gegen das Coronavirus Sars-CoV-2. mRNA-Impfstoffe tragen einen Teil der Erbinformation des Virus, in diesem Fall einen Bestandteil des sogenannten Spikeproteins, welches normalerweise auf der Oberfläche der Viren präsentiert wird. Bei der Impfstoffherstellung wird die mRNA mit Lipiden (Fettstoffen) umhüllt, welche die Aufnahme der mRNA in die Körperzellen nach Applikation sowie die Stabilität der mRNA verbessern. Wird die mRNA von Körperzellen aufgenommen und exprimiert, bildet der Körper das Antigen selbst, ohne mit dem Virus in Kontakt zu kommen. Die Antigene werden vom körpereigenen Immunsystem als „fremd“ erkannt, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird, die einen Schutz vor der Infektion bei einem späteren Kontakt mit dem Virus vermittelt.

Testprinzip zur Überprüfung der Integrität der mRNA

Die Integrität der mRNA ist ein qualitätsbestimmender Parameter dieses Impfstoffes, da nur die intakte mRNA von den Körperzellen exprimiert werden kann. Zur Bestimmung der Integrität muss das die mRNA umhüllende Lipid-Vesikel zerstört werden. Hierfür wird der Impfstoff mit einer Lösung aus einem Detergenz und einem Alkohol gemischt und inkubiert. Anschließend wird die Probe mit einem Marker versetzt, bei 70°C denaturiert und danach mithilfe von Kapillargelelektrophorese am Fragment-Analyzer analysiert.

Bei der Kapillargelelektrophorese wird die Kapillare mit einer Gelmatrix gefüllt. Die Gelmatrix verhindert die Bildung eines elektroosmotischen Flusses, gleichzeitig bildet die Gelmatrix ein Trennmedium, wodurch die mRNA Moleküle entsprechend ihres Größe-Ladungsverhältnisses aufgetrennt werden. Durch elektrokinetische Injektion wird die mRNA in die Kapillare geladen. Durch Anlegen einer Trennungsspannung wandert die injizierte mRNA im elektrischen Feld durch die gelgefüllte Kapillare. Hierbei werden die Moleküle entsprechend ihres Größe-Ladungsverhältnisses getrennt, wobei kleine Fragmente früher eluieren als die intakte mRNA. Größere Spezies (mRNA-Multimere oder -Aggregate) eluieren entsprechend später. Die Detektion erfolgt über einen in der Gelmatrix vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff. Der Farbstoff interkaliert mit der mRNA zu einem mRNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex. Nach Anregung durch einen Laser wird Licht emittiert, welches mit dem Gerätedetektor des Fragment-Analyzers detektiert wird.





Nach der Trennung erfolgt die Quantifizierung mithilfe einer Software. Dabei wird die Integrität der mRNA als %-Anteil des Hauptpeaks (intakte mRNA) zur gesamten detektierten Fläche im Chromatogramm bestimmt.

Testprinzip zur Überprüfung der Identität der mRNA

Zur Überprüfung der Identität der mRNA wird eine „Single Step Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)“ durchgeführt. Bei der RT-PCR wird in Echtzeit die Fluoreszenz einer fluorophormarkierten, sequenzspezifischen Sonde gemessen. Für dieses Verfahren werden Primer und Sonden verwendet, die für die Spike-Glykoproteinsequenz spezifisch sind.

Basierend auf dem ermittelten Ct-Wert (Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet), kann die Identität der mRNA bestätigt werden.

Bei jedem Testdurchlauf wird eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen, und eine Positive Kontrolle, um die Gültigkeit des Assays sicherzustellen.

Charakterisierung der Farbigkeit und Streustärke der Dispersion

Für diese Frage (Überprüfung der Farbigkeit) verweisen wir auf die Monographien der europäischen Pharmakopoe, in denen die angewandte Methode beschrieben wird.

2. Method of Analytics

2.2.2. Degree of Coloration of Liquids

2.9.22 Softening time determination of lipophilic suppositories

