

## ETAT DES LIEUX SUR LES HEPARINES

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
<b>II. RAPPEL DU CONTEXTE</b> .....	<b>2</b>
<b>III. REGLEMENTATION APPLICABLE / GUIDES EN VIGUEUR</b> .....	<b>3</b>
<b>IV. VOIES D'OBTENTION DE L'HEPARINE PURIFIEE</b> .....	<b>4</b>
IV.1. Procédé d'obtention .....	4
IV.2. Activités réalisées par les différents acteurs .....	5
IV.3. Contrôle de l'origine de l'héparine .....	5
IV.4. Sources d'approvisionnement pour les sites de fabrication en France .....	6
<b>V. BILAN DES INSPECTIONS RECENTES</b> .....	<b>7</b>
V.1. Collaboration entre autorités compétentes.....	7
V.2. Inspections en France .....	8
V.3. Inspections à l'international .....	8
V.3.1 Campagne d'inspections récentes (2012/2013).....	8
V.3.2 Campagne d'inspections de 2008 à 2012.....	9
<b>VI. BILAN DES CONTROLES</b> .....	<b>10</b>
VI.1. Prélèvements réalisés durant la campagne d'inspection Chongqing Imperial (nov. 2012) .....	10
VI.2. Programme de surveillance des héparines par la Direction des Contrôles de l'ANSM .....	11
<b>VII. EVALUATION ET GESTION DES RISQUES</b> .....	<b>12</b>
VII.1. Evaluation de la sécurité virale des produits ainsi que du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales (EST).....	12
VII.2. Autres risques liés à l'utilisation frauduleuse de sources animales non approuvées.....	12
VII.3. Risques liés à la mise en œuvre d'un traitement chimique oxydant supplémentaire .....	13
VII.4. Risques liés à la contamination par la chondroïtine persulfatée .....	13
<b>VIII. CONCLUSION</b> .....	<b>14</b>
<b>IX. LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>15</b>
<b>X. ACRONYMES</b> .....	<b>15</b>

Diffusion

Site internet de l'ANSM

## I. INTRODUCTION

L'héparine est un anticoagulant utilisé depuis plus de 60 ans en prévention ou en traitement des thromboses (caillot dans une veine ou une artère). Il s'agit d'un médicament très couramment utilisé, en particulier en milieu hospitalier pour des besoins vitaux. Sa disponibilité constitue donc un enjeu majeur pour le traitement des patients dans les pathologies thrombotiques. C'est un mélange complexe de molécules d'un glycosaminoglycane sulfaté d'origine naturelle présent dans les tissus des mammifères. Pour les marchés européens et états-unis, les héparines sodique, calcique<sup>1</sup> ou de basse masse moléculaire<sup>2</sup> (HBMM) sont exclusivement fabriquées à partir de muqueuse intestinale d'origine porcine.

Pour répondre aux besoins mondiaux en héparine, près de 500 millions de porcs sont nécessaires et proviennent de 55 à 60% de République Populaire de Chine. La découverte en mars 2013 de plusieurs milliers de carcasses de porcs dans le Huangpu, le fleuve de Shanghai, rappelle l'impact qu'aurait une épidémie porcine chinoise sur la production mondiale d'héparine<sup>3</sup>.

Cette synthèse a pour but de dresser un état des lieux relatif à la qualité et à l'approvisionnement des héparines à partir des résultats des enquêtes et des inspections réalisées.

## II. RAPPEL DU CONTEXTE

Dans le contexte de la contamination frauduleuse des héparines porcines issues de fournisseurs chinois par de la chondroïtine persulfatée (CP) intervenue en 2008 et ayant causé des morts en Allemagne et aux USA, l'Agence française a été amenée à prendre des mesures dans la gestion de cette crise.

En mars 2008, un contrôle du marché des héparines fabriquées en France a été mis en place, quelle que soit l'origine des matières premières et son marché de destination. Indépendamment de la recherche de CP par les méthodes préconisées, la recherche d'une possible contamination par d'autres espèces a été effectuée par un laboratoire indépendant.

En avril 2008, l'Agence a informé les opérateurs des mesures immédiates à prendre concernant autant le contrôle d'espèce que la présence d'impuretés.

Ainsi, la mise en place de mesures a été demandée par l'Agence aux opérateurs avant même que la révision des monographies, applicable au 1<sup>er</sup> août 2008, rendue nécessaire par la crise sanitaire de la contamination par de la chondroïtine persulfatée soit engagée par la Pharmacopée européenne (PE).

La France a par ailleurs participé activement à la révision des monographies PE des héparines, notamment sur les aspects liés à la recherche d'origine d'espèces et à l'absence de matériel provenant des autres espèces au moyen d'essais appropriés.

Depuis 2010, la monographie PE des héparines exige la recherche de traces de chondroïtine persulfatée par les techniques de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H) et de chromatographie liquide haute pression (CLHP).

Des inspections régulières basées sur les principes de gestion du risque qualité des sites de fabrication en France sont diligentées avec pour un des objectifs le suivi de la traçabilité des approvisionnements et des contrôles à réception de matières premières. Aucune non-conformité majeure en inspection n'a été relevée depuis la crise de 2008. Afin de renforcer la connaissance de la chaîne d'approvisionnement de l'héparine, depuis les abattoirs jusqu'au fabricant de la substance active, une campagne d'inspection en France et en pays tiers a été réalisée en 2012 et 2013.

<sup>1</sup> L'héparine calcique est obtenue par traitement de l'héparine sodique avec du chlorure de calcium.

<sup>2</sup> Les héparines de basse masse moléculaire sont obtenues par fractionnement ou dépolymérisation de l'héparine d'origine naturelle qui satisfait, selon le cas, à la monographie *Héparine sodique* (0333) ou *Héparine calcique* (0332) pour administration parentérale, sauf exception justifiée et autorisée.

<sup>3</sup> <http://www.theguardian.com/world/2013/mar/22/dead-pigs-chinese-river-rises>

### III. REGLEMENTATION APPLICABLE / GUIDES EN VIGUEUR

Les référentiels de bonnes pratiques, opposables ou non opposables, applicables aux héparines sont listés ci-après :

- Partie II des Bonnes Pratiques de Fabrication pour les substances actives utilisées comme matières premières dans les médicaments ;

Type de fabrication	Application de ces bonnes pratiques aux étapes (indiquées dans les cases grisées) utilisées dans ce type de fabrication				
Les substances actives issues de sources animales	Collecte d'organes, de liquides ou de tissus	Découpe, mélange et/ou traitement préliminaire	Introduction de la matière première de départ de la substance active dans le procédé	Isolement et purification	Traitements physiques et conditionnement

- Annexe 2 des Bonnes Pratiques de Fabrication des substances actives et des médicaments biologiques à usage humain ;

Type et source de la matière	Exemple de produit	Application de ce guide aux étapes de fabrication indiquées en gris			
Sources animales ou végétales : non transgéniques	<b>Héparines</b> , insuline, enzymes, protéines, extraits allergéniques, immunosérums, MTI	Collecte de plante, d'organe, de tissu ou de liquide	Découpe, mélange et/ou traitement préliminaire	Isolement et purification	Formulation, répartition

L'héparine est une substance active d'origine biologique et sa fabrication est soumise aux Bonnes Pratiques de Fabrication dès l'étape de collecte du mucus à partir des intestins de porcs. Des exigences croissantes des BPF doivent être appliquées tout au long du procédé, de l'extraction du mucus jusqu'à l'héparine purifiée, en passant par les étapes intermédiaires d'obtention du brut de l'héparine brute et de l'héparine brute. Par ailleurs, l'étendue de l'application de principes BPF aux abattoirs est définie dans la section B1.2 de l'annexe 2 des BPF.

- Pharmacopée européenne [monographies n° 0332 (héparine calcique), n° 0333 (héparine sodique), et n° 0828 (héparines de basse masse moléculaire)]. Les monographies en vigueur précisent que l'héparine sodique/calcique peut être préparée soit à partir de poumon de bœuf, soit à partir de muqueuse intestinale, soit de porc, soit de bœuf, soit de mouton. Le «soit» étant considéré comme exclusif.
- Un projet de révision des monographies PE de l'héparine, présenté dans le volume 25.1 de Pharmeuropa de janvier 2013, est actuellement en cours d'examen :
  - o il est proposé de restreindre l'objet de la monographie à l'héparine d'origine porcine, certaines des exigences récemment introduites n'étant pas applicables aux héparines d'autres origines. Il est en outre apparu, après une enquête conduite auprès des autorités nationales, que tous les produits à base d'héparine présents sur le marché européen sont d'origine porcine ;
  - o une disposition introduite lors de la dernière révision exigeait que soient vérifiées l'identité de l'espèce source et l'absence de matériel provenant d'autres espèces susceptibles de contamination croisée. Des indications reflétant les pratiques actuelles ont été ajoutées pour préciser cette disposition : *"la méthode utilisée pour confirmer l'identité de l'espèce source, ainsi que l'étape du processus où elle est appliquée, ont été validées pour leur capacité à permettre d'identifier la présence d'héparine d'autres espèces à une teneur de 0,1 pour cent (m/m, en termes d'héparine). Pour la vérification de l'identité des espèces, l'adéquation des méthodes fondées sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) de séquences d'ADN spécifiques de l'espèce a été largement établie. Si une méthode de ce type a été choisie, elle est également utilisée pour rechercher l'ADN porcine et établir qu'il est présent à une teneur constante, en accord avec le procédé de production utilisé"*.

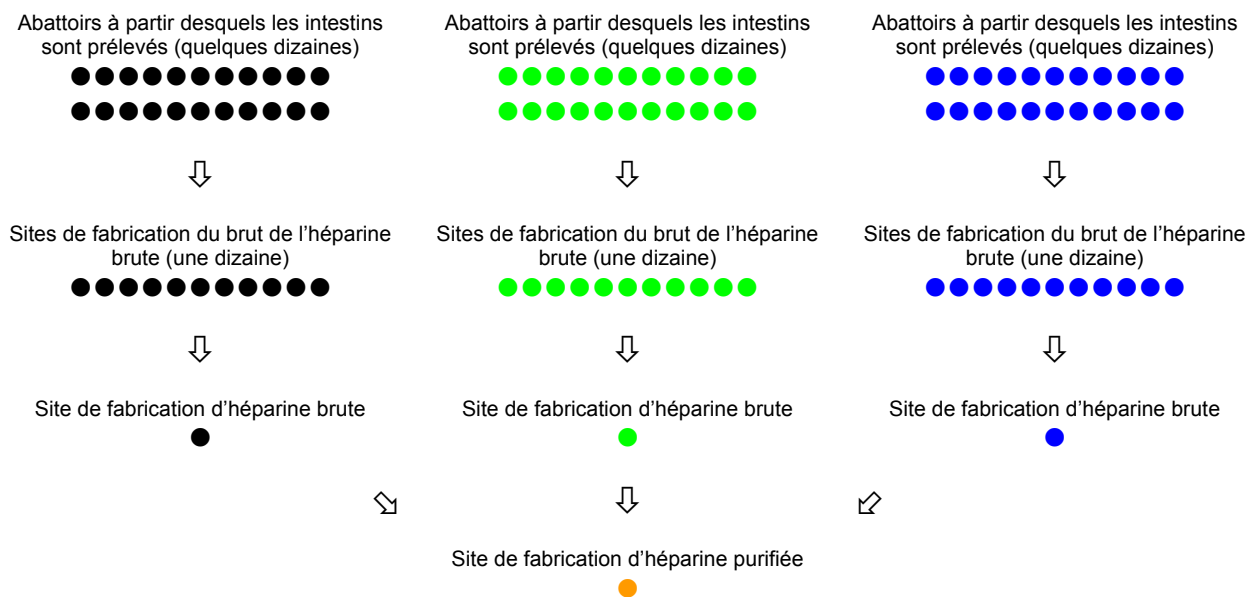
- «Biologics Working Party guideline on the use of starting materials and intermediates collected from different sources in the manufacturing of non-recombinant biological medicinal products» (**Annexe 1**). Date d'application : 01 décembre 2013. Le mucus est défini comme la matière première de départ de l'héparine purifiée ainsi que des héparines de basse masse moléculaire. Cette nouvelle définition doit être prise en compte dans les dossiers d'autorisation de mise sur le marché.

## IV. VOIES D'OBTENTION DE L'HEPARINE PURIFIEE

### IV.1. Procédé d'obtention

La fabrication d'héparine met en jeu un nombre très important d'acteurs, ce qui rend la chaîne d'approvisionnement très complexe.

A titre d'exemple, une chaîne d'approvisionnement théorique d'un site de fabrication d'héparine purifiée est donnée ci-dessous :



Un lot d'héparine purifiée peut être obtenu à partir de plusieurs lots d'héparine brute, eux-mêmes produits sur des sites différents. De même, un site de fabrication d'héparine brute peut ainsi être approvisionné en brut d'héparine brute par plusieurs sites indépendants, chaque site de fabrication du brut de l'héparine brute étant lui-même approvisionné en intestins porcins par plusieurs abattoirs.

Cette complexité nécessite la mise en place de systèmes de gestion de la qualité robustes au niveau de chaque maillon de la chaîne afin d'assurer la traçabilité des opérations. A titre d'exemple, le schéma ci-dessus représente plus de **100 acteurs** dans la chaîne d'approvisionnement pour le site de fabrication d'héparine purifiée.

## IV.2. Activités réalisées par les différents acteurs

<b>Etapes</b>	<b>Acteurs</b>
Collecte des intestins de porcs (avec stabilisation optionnelle du mucus)  ↓	Abattoirs
Collecte du mucus à partir des intestins (avec stabilisation optionnelle du mucus)  ↓  Digestion du mucus et purification par traitement sur résine pour obtenir le brut de l'héparine brute	Sites de fabrication du brut de l'héparine brute
↓  Traitement sur résine et purification pour obtenir l'héparine brute	Site de fabrication de l'héparine brute
↓  Purification/oxydation <sup>4</sup> pour obtenir l'héparine purifiée	Site de fabrication de l'héparine purifiée

## IV.3. Contrôle de l'origine de l'héparine

Le procédé d'inactivation virale de l'héparine est classiquement réalisé par un traitement en milieu oxydant lors de l'étape d'obtention de l'héparine sodique purifiée à partir de l'héparine sodique brute. Cependant, réaliser un traitement oxydant lors de l'obtention de l'héparine sodique brute conduit à dégrader tout acide désoxyribonucléique (ADN) ce qui ne permet plus la détection potentielle par la méthode PCR<sup>5</sup> d'ADN de ruminants à ce stade.

Afin de fiabiliser la détection potentielle d'ADN de ruminants dans l'héparine et d'éviter ainsi toute contamination croisée, les fabricants de médicaments doivent s'assurer au moyen d'audits de la réalisation des analyses PCR sur de l'héparine n'ayant subi aucun traitement oxydant (brut de l'héparine brute ou héparine brute).

Trois publications récentes<sup>6</sup> montrent que la technique de la RMN <sup>1</sup>H peut constituer un outil approprié pour la mise en évidence de la nature des oxydants utilisés dans le processus de purification de l'héparine. La présence d'un singulet à 2.10 ou 2.18 ppm est respectivement le marqueur d'un traitement par du permanganate de potassium ou de l'acide peracétique.

<sup>4</sup> Le procédé d'inactivation virale est réalisé par un traitement en milieu oxydant (KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) lors de l'étape d'obtention de l'héparine purifiée à partir de l'héparine brute.

<sup>5</sup> Une nouvelle méthode PCR, plus sensible, a été validée et mise en ligne en juin 2013 sur le site de l'US-FDA (**Annexe 2**).

<sup>6</sup> P.Mourier et al, J Pharm Biomed Anal **2011** Jan 25;54(2):337-44 ;

D.Beccati et al, Carbohydrate Polymers 82 **2010** 699-705 ;

Mourier et al J Pharm Biomed Anal **2012** Aug-Sep;67-68:169-75.

#### **IV.4. Sources d'approvisionnement pour les sites de fabrication en France**

Pour le marché européen, les différentes héparines (sodique/calciq/ HBMM) sont exclusivement fabriquées à partir de muqueuse intestinale d'origine porcine. Il est à noter que le cheptel porcine élevé au sein de l'Union européenne comprend environ 150 millions de têtes<sup>7</sup>, ce qui rend nécessaire l'importation d'héparine sodique en provenance de pays tiers à l'Europe afin de répondre aux besoins du marché.

Les deux sites de fabrication en France de produits issus de l'héparine sont :

- **1) ASPEN ex- Glaxo Welcome Production (Notre Dame de Bondeville)**

ASPEN fabrique la nadroparine calciq (HBMM) à partir de l'héparine sodique purifiée pour les spécialités Fraxiparine<sup>®</sup> et Fraxodi<sup>®</sup>.

Les fabricants de l'héparine sodique purifiée utilisée pour la production de nadroparine calciq sont exclusivement états-uniens et européens, le mucus porcine étant d'origine nord-américaine et européenne.

La chaîne d'approvisionnement inclut la transformation du mucus en matière première (après digestion enzymatique et fixation sur résine), la production d'héparine sodique brute et enfin la purification finale.

- **2) Sanofi Chimie (Ploërmel)**

Sanofi Chimie fabrique de l'héparine sodique purifiée à partir de mucus intestinal de porc en provenance d'abattoirs français ou à partir d'héparines sodiques brutes de différentes origines (Europe, Etats-Unis, République Populaire de Chine). L'héparine sodique purifiée est l'intermédiaire de la fabrication de l'énoxaparine sodique, substance active du Lovenox<sup>®</sup>. La fabrication de l'énoxaparine sodique est achevée soit sur le site Aventis Pharma Manufacturing à Singapour ou celui de VLG Chem à Villeneuve la Garenne.

Le site de Ploërmel fabrique également deux autres héparines purifiées (sodique et calciq) à partir principalement d'héparine brute.

---

<sup>7</sup> <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/conjinforap201305pcfr.pdf>

## V. BILAN DES INSPECTIONS RECENTES

### V.1. Collaboration entre autorités compétentes

L'application des textes est régulièrement vérifiée lors des inspections quels que soient la catégorie d'établissements (fabricants, distributeurs ou importateurs), les lieux de fabrication des médicaments (France et pays tiers, sachant que pour le territoire de l'Union européenne, ce sont les autorités nationales compétentes concernées qui sont en charge des inspections) et la catégorie de médicaments (princeps et génériques).

D'un point de vue global, les inspections confirment une mondialisation des acteurs intervenant dans la chaîne de production et de distribution des substances actives, plus particulièrement en Asie. Cette dispersion des opérateurs rend plus difficile leur suivi et leur contrôle tant par les donneurs d'ordre au travers d'audits que par les autorités compétentes par les inspections.

L'action de l'ANSM s'inscrit donc dans un cadre coordonné avec les autres Etats Membres de l'UE et la DEQM, tout particulièrement pour ce qui concerne les inspections dans des pays situés en dehors de l'Union. Ce cadre est porté principalement par le caractère obligatoire de la reconnaissance mutuelle des inspections faites par les autres Etats Membres de l'UE et de l'échange d'information. Il faut donc envisager la capacité d'inspection non seulement sur les seules ressources françaises mais aussi en y ajoutant celles des autres Etats Membres et de la DEQM ainsi que celles d'Etats ayant conclu des accords spécifiques avec l'Union européenne.

L'ANSM et ses homologues des agences européennes et internationales coordonnent en conséquence leurs actions d'inspections afin d'optimiser la surveillance de ces activités en pays tiers. Des inspections conjointes et des échanges concernant la programmation des inspections, organisées en liaison avec l'EMA et la DEQM notamment, permettent ainsi de couvrir les sites lointains et d'échanger des informations sur les résultats de ces inspections. Une mutualisation des résultats des inspections est réalisée en intra-européen via une base de données qui contient tous les certificats de conformité délivrés par les autorités nationales de régulation concernées y compris pour des inspections extracommunautaires (EudraGMDP<sup>8</sup>).

Néanmoins, compte tenu du nombre important d'opérateurs intervenant dans la chaîne d'approvisionnement de l'héparine, des abattoirs jusqu'au site de purification, il est à noter que la majeure partie des sites, notamment l'amont de la chaîne, ne seront jamais inspectés même dans le cadre d'un effort coordonné des autorités. L'effort d'inspection est donc principalement dirigé vers les étapes de fabrication de l'héparine brute et purifiée.

Cette stratégie de surveillance par les autorités s'établit dans un contexte réglementaire harmonisé au niveau communautaire dans lequel la responsabilité quant à la qualité des substances actives incombe en premier lieu aux fabricants de médicaments, dont la Personne Qualifiée (Pharmacien Responsable en France) en est le garant.

---

<sup>8</sup> <http://eudragmp.ema.europa.eu/>

## **V.2. Inspections en France**

Les inspections<sup>9</sup> récentes des 2 sites de fabrication des substances actives précités sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Etablissement	Dates d'inspection
ASPEN ex-Glaxo Wellcome Production (Notre Dame de Bondeville)	29 - 31 mai 2012 13 - 15 mai 2008
Sanofi Chimie (Ploërmel)	23 - 25 octobre 2012 15 - 17 décembre 2009 21 - 23 mai 2008

Ces inspections ont permis de s'assurer que les acteurs de toute la chaîne d'approvisionnement sont régulièrement audités par les fabricants, incluant des visites d'abattoirs. Globalement, les fréquences d'audit établies par les fabricants sont :

- d'une fois par an pour les sites producteurs d'héparine sodique purifiée ;
- d'une fois tous les 3 ans pour les sites réalisant la transformation du mucus en matière première ou la production d'héparine sodique brute.

Ces inspections n'ont pas relevé de dysfonctionnement majeur ou critique et ont souligné une conformité aux BPF maîtrisée pour ces deux fabricants.

Il est à noter qu'ASPEN et Sanofi Chimie sont par ailleurs régulièrement inspectés par l'US-FDA. Les dernières inspections de Sanofi Chimie (mars 2012) et d'ASPEN (septembre 2013) ont conclu à la conformité des activités.

## **V.3. Inspections à l'international**

### V.3.1 Campagne d'inspections récentes (2012/2013)

Cette campagne s'est principalement concentrée sur trois sites de République Populaire de Chine :

- Nanjing King-Friend Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd. (NKF) ;
- Shenzhen Hepalink Pharmaceutical Co. Ltd. (SHP) ;
- Chongqing Imperial Bio-chem (CIB).

Les deux premiers fabricants sont deux acteurs majeurs de la production d'héparine en République Populaire de Chine et fournissent à la fois le marché européen et états-unien. Le troisième fabricant faisait l'objet d'une demande de variations dans plusieurs pays européens comme producteur et fournisseur de l'intermédiaire héparine sodique brute.

### Inspections Nanjing King-Friend Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd. et Shenzhen Hepalink Pharmaceutical Co. Ltd.

Ces inspections ont été réalisées respectivement du 18 au 21 décembre 2012 et du 8 au 11 janvier 2013 par les autorités états-uniennes.

Il est à noter qu'il s'agissait des premières inspections inopinées réalisées par l'US-FDA en République Populaire de Chine et qu'aucun dysfonctionnement significatif n'a été relevé lors de ces inspections.

Un point intéressant est toutefois à souligner concernant des lots d'héparine brute d'origine NKF refusés par un fabricant pharmaceutique situé aux Etats-Unis pour présence de traces d'ADN de ruminants à hauteur de 0,4-0,5 ppm.

L'origine avancée de cette contamination serait liée à l'alimentation des porcs<sup>10</sup>, associée à un nettoyage insuffisant des intestins avant l'opération de collecte du mucus.

<sup>9</sup> Les inspections des sites de production d'énoxaparine ne sont pas incluses dans cet état des lieux.

<sup>10</sup> Le porc étant un animal omnivore, son régime alimentaire comporte aussi bien des aliments d'origine végétale qu'animale (dont potentiellement de la viande de ruminants).



## Inspection Chongqing Imperial Bio-chem (RP Chine)

Cette inspection a été réalisée du 5 au 16 novembre 2012 par les autorités Irlandaises, Danoises et Françaises.

La totalité de la chaîne d'approvisionnement a été revue au cours de l'inspection :

- deux abattoirs ;
- un des sites de fabrication du brut de l'héparine brute ;
- le laboratoire sous-traitant réalisant l'analyse RMN <sup>1</sup>H ;
- le site de fabrication de l'héparine brute ;
- le siège de l'établissement Chongqing Imperial Bio-chem.

Il a été relevé lors de l'inspection du fabricant d'héparine sodique brute 34 écarts aux BPF dont 3 critiques et 9 majeurs. Par ailleurs, l'inspection du site fabricant du brut de l'héparine brute a relevé 12 écarts dont 1 critique et 2 majeurs.

L'analyse des constats met en évidence qu'environ 40% des écarts observés sont relatifs à la gestion des matières. Deux des quatre écarts critiques (1 pour le fabricant de brut d'héparine brute et 1 pour le fabricant d'héparine brute) sont également liés à des manquements dans ce domaine.

Deux rapports de non conformités décrivant les actions entreprises ont été rendus publics sur la base de données communautaire EudraGMPD<sup>11</sup>. Cette source d'héparine n'a pas été approuvée pour le marché européen.

### V.3.2 Campagne d'inspections de 2008 à 2012

Une compilation des historiques d'inspections de fournisseurs d'héparines (purifiée et brute) localisés en pays tiers par les autorités compétentes a été réalisée pour la période 2008 - 2012.

Les sources utilisées pour cette recherche ont été :

- les données EMA quant à la liste des inspections pays tiers réalisées par les autorités compétentes ;
- le récapitulatif à mars 2012 de l'origine des héparines pour les autorisations de mise sur le marché (AMM) enregistrées en France ;
- les données alimentées dans la base EudraGMDP par les Etats Membres ;
- l'historique d'inspections de l'ANSM ;
- les historiques d'inspections des autres autorités disponibles en ligne, notamment pour ce qui concerne l'US-FDA.

Cette étude a conduit à l'identification d'environ 40 acteurs de la chaîne d'approvisionnement amont de l'héparine, parmi lesquels 19 établissements sont localisés en République Populaire de Chine. Globalement, sur la période 2008 – 2012, 44 inspections ont été diligentées par les autorités compétentes [ANSM/US-FDA/TGA/DEQM/ZLG (GE)/AEMPS/MHRA/IGZ (NL)].

D'une manière générale, il a été relevé que le niveau de conformité aux BPF de ces sites était satisfaisant. Les sites pour lesquels des manquements importants ont été relevés ont fait l'objet de suites administratives et n'approvisionnent pas le marché européen.

---

<sup>11</sup> <http://eudragmp.ema.europa.eu/> ; NCS # 2012/5767 et 2012/5768

## VI. BILAN DES CONTROLES

### VI.1. Prélèvements réalisés durant la campagne d'inspection Chongqing Imperial (nov. 2012)

Il s'agissait de la première campagne de prélèvements, réalisée à différents stades de fabrication de l'héparine (brut de l'héparine sodique brute / héparine sodique brute), dans le cadre d'une surveillance européenne de la chaîne de fabrication de l'héparine sodique en République Populaire de Chine.

Les 28 échantillons prélevés étaient de quatre types :

- brut d'héparine sodique brute (17) ;
- héparine sodique brute (3) ;
- héparine sodique brute de qualité «sans protéines»<sup>12</sup> (7) ;
- résine échangeuse d'ions utilisée pour l'obtention d'héparine sodique brute (1).

Les échantillons ont été testés sur la période 2013/2014 par les laboratoires de Contrôles (OMCLs) de cinq états membres : Suède, Royaume-Uni, Allemagne, Italie et Danemark.

Les contrôles se sont déroulés en 3 phases :

- 1) Analyses par RMN <sup>1</sup>H [Suède] :
  - identification de l'héparine ;
  - recherche de chondroïtine persulfatée ;
  - dosage du sulfate de dermatan (impureté de l'héparine) ;
- 2) Dosages biologiques [Royaume-Uni et Allemagne] ;
- 3) Analyses par PCR [Italie, Suède, Danemark]  
L'objectif était de déterminer la présence d'ADN porcine et l'absence d'ADN de ruminants. Trois méthodes différentes ont été mises en œuvre :
  - A : méthode du laboratoire de contrôle des autorités italiennes ;
  - B : méthode validée en 2013 par l'US-FDA ;
  - C : méthode enregistrée dans le dossier d'AMM du fabricant d'héparine HBMM à l'origine de la demande de variation.

Les résultats communiqués à l'ANSM en février 2014 font apparaître les points suivants :

- 1) les résultats des contrôles des phases 1 et 2 sont tous conformes aux spécifications :
  - présence d'héparine ;
  - absence de chondroïtine persulfatée (limite de détection de la méthode : 0.1%) ;
  - présence de sulfate de dermatan (entre 3 et 12%) ;
  - résultats des dosages biologiques conformes aux spécifications du fabricant d'héparine de base masse moléculaire ;
- 2) les résultats des contrôles PCR de la phase 3 n'ont pas mis en évidence d'utilisation avérée de mucus de ruminants dans les processus de fabrication des lots examinés.  
La mise en œuvre de 3 méthodes PCR différentes dans cette étude, méthodes différant à la fois au niveau des techniques d'extraction et d'amplification, a conduit à mettre en évidence un besoin de standardisation afin de fiabiliser les résultats obtenus et pouvoir tirer les conclusions appropriées. Un projet en ce sens est porté au niveau européen et des discussions sont en cours avec les OMCLs concernés et la DEQM. Dans une deuxième phase, il est projeté de proposer à l'US-FDA et aux autres autorités de s'engager dans ce travail collaboratif de standardisation.

---

<sup>12</sup> La production d'héparine sodique brute de qualité «sans protéines» fait intervenir une étape de traitement par le peroxyde d'hydrogène.

## **VI.2. Programme de surveillance des héparines par la Direction des Contrôles de l'ANSM**

Afin d'effectuer une surveillance renforcée de la qualité des héparines mises sur le marché en France, une enquête portant à la fois sur des médicaments (fabricants : Sanofi-Aventis et Panpharma) et des matières premières entrant dans la fabrication de ces médicaments a été réalisée en 2013.

Cette surveillance s'inscrivait également dans le cadre du programme européen au sein du réseau des OMCLs.

Le protocole d'étude incluait les contrôles de 13 lots de médicaments ainsi que de 14 lots de matières premières (6 lots d'héparine calcique purifiée et 8 lots d'héparine sodique purifiée).

Dans le cas des médicaments, des analyses physicochimiques et biologiques ont été réalisées conformément aux dossiers de demande de mise sur le marché.

Dans le cas des matières premières, seules des analyses physicochimiques ont été réalisées :

- impuretés et contaminants par électrophorèse capillaire (chondroïtine persulfatée/sulfate de dermatan) ;
- substances apparentées par CLHP/IEC (sulfate de dermatan/sulfate de chondroïtine/autres impuretés) ;
- impuretés nucléotidiques par UV.

Tous les résultats ont été conformes aux spécifications en vigueur.

Pour les matières premières, il est important de noter qu'une comparaison de ces résultats avec ceux de la campagne de prélèvements en République Populaire de Chine développée au paragraphe précédent n'est pas possible, car ces derniers concernaient des matières brutes non encore purifiées analysées avec des techniques différentes.

## **VII. EVALUATION ET GESTION DES RISQUES**

### **VII.1. Evaluation de la sécurité virale des produits ainsi que du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales (EST)**

Dans le cadre de dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché, l'évaluation de la sécurité d'un produit d'origine biologique comme les héparines repose sur la qualité de la matière première utilisée (espèce, origine géographique, tissu, état sanitaire, traçabilité, contrôles) et le procédé de fabrication. En l'occurrence, les exigences générales sur la sécurité virale ainsi que sur la réduction du risque EST sont fournies par la Pharmacopée européenne aux *chapitres 5.1.7 et 5.2.8*. Des recommandations supplémentaires comprenant les études de validation virale sont fournies par la *Note explicative relative aux études de validation virologique : planification, contribution et interprétation des études validant l'inactivation et l'élimination des virus (CPMP/BWP/268/95)*.

Néanmoins, si le dossier d'AMM constitue un engagement sur les contrôles mis en œuvre et le procédé permettant d'obtenir un médicament dont la qualité est corrélée à l'efficacité et à la sécurité du médicament, il n'a pas pour objet de garantir l'absence de toute possibilité d'accident ou de fraude.

Suite aux travaux de l'INRA sur la technique ELISA développée dans le but de détecter de possibles contaminations par des produits bovins, ovins et caprins, l'Agence a réalisé un bilan en 2008 des dossiers et conduit une enquête de traçabilité auprès de tous les titulaires d'AMM en France d'héparine. Le but était de dresser un état des lieux de la sécurité virale des héparines extraites à partir d'intestins de porc et plus particulièrement des mesures mises en place afin de maîtriser la qualité de la matière première brute et notamment de s'assurer de l'origine d'espèce du matériel de départ (enquête de traçabilité des matières premières brutes pour la fabrication d'héparine). Les éléments fournis par les firmes ont permis de faire une analyse de risque relative à la contamination des matières premières porcines par des tissus de ruminants, et donc de quantifier le risque potentiel théorique maximal de contamination par des prions.

Par ailleurs, afin de conforter l'analyse de risque effectuée sur la base des informations transmises, une série d'inspections régulières des deux fabricants en France ASPEN, ex-Glaxo Wellcome Production, et Sanofi Chimie et d'audits par ces fabricants de leurs fournisseurs de matières premières, a été effectuée afin de vérifier sur place la maîtrise de la traçabilité ascendante.

### **VII.2. Autres risques liés à l'utilisation frauduleuse de sources animales non approuvées**

La monographie PE de l'héparine en vigueur autorise plusieurs espèces (poumon de bœuf ; muqueuse intestinale de porc/mouton/bœuf) mais exige que soient vérifiées l'identité de l'espèce source et l'absence de matériel d'autres espèces pouvant être la source de contamination croisée.

Le risque lié à une utilisation de mucus de ruminants existe mais reste maîtrisé dans la mesure où d'une part une surveillance des opérateurs est assurée par les autorités et les fabricants de médicament et d'autre part une recherche systématique sur chaque lot d'héparine de la présence de protéine animale autre que porcine est effectuée. Par ailleurs, le risque EST/ESB est réduit par la mise en place de traitements appropriés dans les procédés de fabrication de l'héparine sodique purifiée à partir d'héparine sodique brute.

Cependant, l'utilisation frauduleuse d'une héparine résultant d'un mélange d'héparines issues de diverses espèces sources (porcine et ruminants) pourrait être à l'origine d'autres risques potentiels :

- le profil d'impureté d'une héparine issue des deux espèces pourrait être différent et déclencher des réactions immunogènes (les tests de l'USP et de l'EP ne permettent pas de distinguer des protéines de source différentes) ;
- la traçabilité de la chaîne d'approvisionnement ne serait plus assurée afin d'apporter la garantie de l'origine et de l'état sanitaire des animaux utilisés.

### **VII.3. Risques liés à la mise en œuvre d'un traitement chimique oxydant supplémentaire**

Le procédé d'inactivation virale de l'héparine est classiquement réalisé par un traitement en milieu oxydant ( $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lors de l'étape d'obtention de l'héparine sodique purifiée à partir de l'héparine sodique brute. Cependant, une étape d'oxydation préalable peut également être mise en œuvre dans certains procédés de fabrication d'héparine sodique brute d'origine chinoise.

L'ADN étant dégradé en milieu oxydant, cette pratique ne permet plus la détection potentielle par la méthode PCR d'ADN de ruminant à partir d'héparine sodique brute et pourrait être utilisée par des fraudeurs pour masquer l'utilisation de mucus de ruminants.

Il n'a pas été démontré qu'une telle étape d'oxydation supplémentaire avait un impact défavorable sur la qualité de l'héparine. Cependant plusieurs facteurs doivent être pris en considération :

- la pureté de l'agent oxydant utilisé ;
- l'oxydation pourrait avoir un impact sur la structure des impuretés présentes en début du procédé et conduire à des problèmes de purification de l'héparine ;
- les signaux RMN  $^1\text{H}$  / RMN  $^{13}\text{C}$  caractéristiques d'autres impuretés peuvent être masqués dans le spectre RMN de l'héparine et de ce fait ne pas être détectés ;
- la qualité de l'ADN porcin qui serait rajouté en final pour masquer l'opération de destruction de l'ADN d'origine de ruminants n'est pas connue.

### **VII.4. Risques liés à la contamination par la chondroïtine persulfatée**

Le risque est maîtrisé avec la recherche systématique de traces de chondroïtine persulfatée par les techniques de RMN  $^1\text{H}$  et de CLHP sur tous les lots d'héparine sodique.

## VIII. CONCLUSION

Les campagnes d'inspections des sites producteurs d'héparine en France, aux USA et en République Populaire de Chine réalisées en 2012 et 2013 ont permis de mettre en évidence l'extrême complexité de la chaîne d'approvisionnement au niveau de la production de l'héparine d'origine chinoise. Ces inspections ont également permis d'évaluer le niveau de contrôle mis en place par les opérateurs, des abattoirs jusqu'à la substance active.

Les deux établissements localisés en France (ASPEN, ex-Glaxo Welcome Production, et Sanofi Chimie) présentent un niveau de conformité aux bonnes pratiques acceptable. Ces établissements assurent un contrôle régulier des acteurs de toute la chaîne d'approvisionnement (héparine sodique purifiée, héparine brute et brut de l'héparine brute) au travers d'audits incluant la visite d'abattoirs.

Par ailleurs, la première campagne de prélèvement à différents stades de la chaîne de fabrication de l'héparine sodique en République Populaire de Chine a été réalisée durant l'inspection de Chongqing Imperial et les échantillons prélevés ont été testés sur la période 2013/2014 par les laboratoires de Contrôle de 5 Etats membres : Suède, Royaume-Uni, Allemagne, Italie et Danemark.

Cette campagne a fait ressortir un besoin de standardisation des méthodes PCR utilisées afin de fiabiliser les résultats obtenus et ainsi pouvoir tirer les conclusions appropriées. Un projet en ce sens est porté au niveau européen et des discussions sont en cours avec les OMCLs concernés et la DEQM. Dans une seconde phase, il est projeté de proposer à l'US-FDA et aux autres autorités de s'engager dans ce travail collaboratif de standardisation.

Les maillons faibles identifiés de la chaîne d'approvisionnement de l'héparine sodique purifiée sont les sites de fabrication du brut de l'héparine sodique brute et de l'héparine sodique brute. L'amélioration de la qualité et de la sécurité de cette activité repose sur :

- la responsabilité de l'industrie pharmaceutique sur la qualification de l'ensemble des acteurs de la chaîne d'approvisionnement de l'héparine sodique, des abattoirs jusqu'au site de fabrication de l'héparine sodique brute, en passant par les sites de fabrication du brut de l'héparine sodique brute ;
- la mise en œuvre des moyens suffisants pour qualifier tous les acteurs. La fréquence et la durée des audits devront être adaptées à la complexité de la chaîne d'approvisionnement ;
- l'approvisionnement de l'industrie pharmaceutique en héparine sodique brute auprès d'opérateurs chinois enregistrés et régulièrement inspectés par la Chinese Food and Drug Administration (CFDA).

A ce titre, un guide de l'US-FDA à l'usage des opérateurs, pour le contrôle de l'héparine sodique brute, a été rendu public en juin 2013 : "Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality" (**Annexe 3**).

Plusieurs recommandations aux industriels y sont proposées afin de renforcer la chaîne d'approvisionnement de l'héparine :

- contrôle de chaque lot (et de chaque réception) d'héparine brute afin de s'assurer de l'origine exclusivement porcine et de l'absence de contamination par de la chondroïtine persulfatée ;
- connaissance de l'identité et du rôle des fabricants / re-conditionneurs / distributeurs de l'héparine brute et réalisation d'audits réguliers ;
- rejet de tout lot d'héparine brute contenant des traces de chondroïtine persulfatée ou d'ADN de ruminants.

## IX. LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : “Biologics Working Party guideline on the use of starting materials and intermediates collected from different sources in the manufacturing of non-recombinant biological medicinal products”. Date d’application : 01 décembre **2013** ;
- Annexe 2 : “Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Ruminant DNA in Raw Materials used for Monitoring Crude Heparin for Quality”, Sharla M. Peters and al. US-FDA (June **2013**) ;
- Annexe 3 : “Guidance for Industry Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality”, June **2013**.

## X. ACRONYMES

### ADN

Acide désoxyribonucléique

### AMM

Autorisation de mise sur le marché

### ANSM

Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé, autorité compétente française

### BPF

Bonnes pratiques de fabrication

### CLHP

Chromatographie liquide haute pression

### CP

Chondroïtine persulfatée

### DEQM

Direction européenne de la qualité du médicament

### EMA

Agence européenne des médicaments

### ESB

Encéphalopathie spongiforme bovine

### EST

Encéphalopathies spongiformes animales

### IEC

Chromatographie d’échange d’ions

### INRA

Institut national de la recherche agronomique

### ELISA

Enzyme linked immuno sorbent assay (dosage d’immunoabsorption par enzyme liée)

### HBMM

Héparine de basse masse moléculaire

### OMCLs

Laboratoires officiels de contrôle des médicaments

### PCR

Réaction d’amplification en chaîne par polymérase

### PE

Pharmacopée européenne

### RMN <sup>13</sup>C

Résonance magnétique nucléaire du carbone

### RMN <sup>1</sup>H

Résonance magnétique nucléaire du proton

### UE

Union européenne

## **Annexe 1**

«Biologics Working Party guideline on the use of starting materials and intermediates collected from different sources in the manufacturing of non-recombinant biological medicinal products».  
Date d'application : 01 décembre **2013**





EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

London, 27 June 2013  
EMA/CHMP/BWP/429241/2013  
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

## Guideline on the use of starting materials and intermediates collected from different sources in the manufacturing of non-recombinant biological medicinal products

Draft Agreed by Biologics Working Party	December 2011
Adoption by Committee for medicinal products for human use for release for consultation	16 February 2012
End of consultation (deadline for comments)	31 August 2012
Agreed by Biologics Working Party	May 2013
Adoption by Committee for medicinal products for human use	27 June 2013
Date for coming into effect	1 December 2013

<b>Keywords</b>	<i>Starting materials, sourcing, intermediates, heparins, urine derived products, plasma derived medicinal products, manufacturing process.</i>
-----------------	---



# Guideline on the use of starting materials and intermediates collected from different sources in the manufacturing of non-recombinant biological medicinal products

## Table of contents

<b>1. Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Scope</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Legal basis</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Discussion</b> .....	<b>4</b>
4.1 Starting materials and process intermediates.....	4
4.2 Variant manufacturing processes.....	5
<b>5. References</b> .....	<b>8</b>

# 1. Introduction

In 2007 the Co-ordination group for Mutual recognition and Decentralised procedures (CMDh) clarified the regulatory status as “biological medicinal product” for a group of medicinal substances derived from biological sources such as heparins, gonadotrophins and urokinase.<sup>1,2</sup> Therefore requirements outlined in the European pharmaceutical legislation, for particulars and documents that should accompany an application for marketing authorisation of a biological medicinal product, applied to these specific products too.

In view of the general definition of what a biological medicinal product is, as outlined in Annex 1 of Directive 2001/83/EC<sup>3</sup>, knowledge of the manufacturing process and its control is needed for the characterisation and determination of the quality for a biological medicinal product. Therefore, for biological medicinal products the interpretation of European legislation adheres to the principle that the product is defined by its physico-chemical and biological characteristics as well as its manufacturing process and as such within one Marketing Authorisation one process is applied to obtain the active substance.

The marketing authorisation dossier should include information that adequately describes the manufacturing process and process controls. All materials needed in order to manufacture the active substance(s) shall be listed, identifying where each material is used in the process. Information on quality and control of all starting materials and process reagents used in the manufacture of a active substance should be provided. It is thus relevant to clearly define where the manufacturing process starts.

The requirement that the MAH should have full access to the active substance manufacturing data implies that all manufacturing steps and manufacturing sites have to be covered in the marketing authorisation dossier. In particular, this causes complexity for certain non-recombinant products undergoing multi-source processes, i.e. where the starting materials or early intermediates are derived from several suppliers and where the initial processing and the quality control could be different from one supplier to another. Examples of such products are heparins (including Low Molecular Mass Heparins (LMMHs)), urine derived products like gonadotropins and urokinases, and plasma derived medicinal products.

For these products, variability in sourcing and/or initial manufacturing steps has traditionally been allowed in contrast to the well characterised biotechnological products of recombinant origin for which a single manufacturing process starts from a unique and well identified cell bank system. Such variability is triggered by the high demand for the starting material and consequential manufacturing and market logistics. For some non-recombinant products such as heparins or its derivatives there is an increasing difficulty in finding starting materials suppliers. As manufacturers of these products often need to have several suppliers, it is acknowledged that flexibility of sourcing in the biological substances of non-recombinant origin may be needed to ensure product supply.

The multi-step manufacturing processes of biological substances have caused differences in the definition of ‘starting materials’ for the active substance manufacturing by both regulators and industry. Consequently, this resulted in differences in the level of detail for the early manufacturing steps presented in the marketing authorization dossier.

This document clarifies the definition of starting materials for specific groups of biologicals and it presents CHMP’s current position on the use of variant processes in the early manufacturing stages of these products.

## 2. Scope

This guideline addresses to what extent any variability in the early manufacturing steps is acceptable for non-recombinant biological products which contain active substance extracted from organs, tissues or fluids from living organisms, either of animal or plant origin and for which flexibility in the sourcing in the biological starting material may be needed, to ensure product supply.

Major examples are given which illustrate the concept of accepting process variability.

This document also clarifies the definition of starting materials for these products.

The principles outlined in these examples could be applied to other biological medicinal products for which flexibility of sourcing in the biological starting materials may be needed.

For allergens and plasma derived medicinal products it is acknowledged that extensive regulatory/scientific guidance is already available which covers the main issues as outlined in this document. Therefore, these product classes are not further discussed in this guideline.

Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) are excluded from the scope of this document.

This document provides guidance in support of Marketing Authorisation Applications as well as already licensed products.

## 3. Legal basis

This guideline should be read in conjunction with the introduction and general principles (4) and Annex I to Directive 2001/83/EC as amended.

## 4. Discussion

### 4.1 Starting materials and process intermediates

According to Dir. 2001/83/EC, for biological medicinal products, *"starting materials shall mean any substance of biological origin such as micro-organisms, organs and tissues of either plant or animal origin, cells or fluids (including blood or plasma) of human or animal origin, and biotechnological cell constructs (cell substrates, whether they are recombinant or not, including primary cells)."*

The concept of Active Substance Master File, as laid down in Annex I of Directive 2001/83/EC, cannot be applied in the context of biological medicinal products.<sup>4,5</sup> Furthermore, according to the CMDh and CHMP recommendations,<sup>6,7</sup> existing Certificates of Suitability (CEPs) for biological substances of non-recombinant origin cannot replace the relevant data in Module 3. The main reason is that the MAH should have full access to the active substance manufacturing data to take full responsibility for the medicinal product and all of its intermediates and starting materials it is derived from. Consequently, this data should be part of the marketing authorisation dossier for new and existing marketing authorisations.

Within the context of this document "a source" means a certain supplier from which the starting material or intermediate is supplied, irrespective whether this supplier is located inside / outside the EU. For specific GMP aspects related to suppliers located outside the EU please be referred to the relevant GMP legislation. "Multi-source" means that the starting materials or intermediate is supplied from multiple suppliers. It is noted that one source could include multiple slaughterhouses which are under the same pharmaceutical quality control system of the medicinal product manufacturer.

Within the context of this document, a process intermediate is defined as a substance produced during steps of the processing of the active substance that undergoes further molecular change or purification before it becomes the active substance.

Relevant information pertaining to the starting materials, but not necessarily to the description of the manufacturing process, should be presented in Module 3.2.S.2.3 Control of Materials.

Any other substances such as reagents, culture media, foetal calf serum, additives, and buffers involved in chromatography, etc. used in the manufacturing or extraction of the active substance, but from which this active substance is not directly derived, are defined as raw materials. Therefore, these materials are outside the scope of this guidance document.

Examples of two major classes of biological medicinal products are given below.

#### Heparins

Heparin and derivatives fulfil the regulatory definition of 'biological substance' given by Directive 2001/83/EC: the substance is of biological origin and, due to its complexity, a combination of physico-chemical-biological testing together with testing and control of the manufacturing process is needed for its characterisation and determination of quality.

Hence, pooled porcine intestinal mucosae are defined as the starting material for any heparin or LMMH.<sup>i</sup>

Different intermediates may exist and be qualified for use in the manufacture of LMMHs, such as resin bound heparin, partly purified crude heparin or heparin sodium/calcium. However, these intermediates shall not be considered as starting materials according to Directive 2001/83/EC.

Module 3 of the marketing authorization dossier should cover the whole manufacturing process starting from the sourcing of the mucosa. The source materials used for the production of intermediates for the manufacture of medicinal products shall be derived from animals fit for human consumption following ante- and post mortem inspection in accordance with EU or equivalent conditions. Aspects with potential impact on product quality and safety need to be presented in sufficient detail e.g. species and country of origin, traceability from slaughterhouses/abattoirs, prevention of species cross contamination, confirmation that the animals used are fit for human consumption, veterinary certificate, etc.

#### Urine derived products

As for the heparins, urine derived products (e.g. urokinases, gonadotrophins) fulfil the definition of 'biological substance'. Pooled human urine should be defined as the starting material for urine derived medicinal products. Different process intermediates may exist. For example, (resin) adsorbed urokinase, urokinase paste, semi-purified urokinase have been described as process intermediates for medicinal products containing urokinase as the active substance. For the contents of module 3 sufficient details should be provided to enable full assessment of the manufacturing steps. Information should be provided in sufficient detail on safety aspects of the starting material/intermediates such as donor selection criteria, traceability and virus testing.

### **4.2 Variant manufacturing processes**

When defining tissues or fluids, such as urine, as the starting material of the manufacturing process, it is acknowledged that some flexibility within the concept of a single manufacturing process starting

---

<sup>i</sup> Pooled porcine intestinal mucosae can be preserved or non-preserved depending on the local process logistics. In case where the pooled mucosa is preserved, the method of preservation should be described, including the raw materials used, in the MA dossier. This would not necessarily be the point where GMP needs to be applied.

from the biological source materials might be needed, particularly for the very early active substance manufacturing steps. Indeed, for the above mentioned examples, large volumes or quantities of starting materials (porcine mucosa, urine) have to be collected and pre-treated before initiating the final active substance manufacturing steps resulting in an active substance of the desired quality. These first steps of collection, testing and pre-treatment of the starting material may be carried out by different suppliers who could apply different processes to obtain an isolated intermediate. The approach of an intermediate derived from the same starting material but possibly using variant manufacturing processes should however be well defined considering the following aspects.

If multiple processes are used in the early stages, the MAH should justify the use of intermediate(s) manufactured by variant processes.

Information about the manufacturing process, starting from the sourcing of the starting material (e.g. mucosa, urine) should be given for each intermediate. The level of detail should provide sufficient information depending on the stage of the process, with a focus on critical quality attributes and critical process parameters, traceability of supply and demonstrated MAH oversight of the process.

Particular attention should be drawn to those intermediates for which the Company applies several sources in their MA. Quality Attributes for these intermediates (e.g. purity profile, biological activity) should be defined by the manufacturer of the active substance to allow comparison of the quality of these intermediates where they are obtained by different sources and using variant manufacturing processes. Where it is not possible to determine the critical quality attributes at the stage of these intermediates, testing for these quality attributes may be performed at a later stage in the manufacturing process. Any differences among variant processes, e.g. additional purification/extraction step, process conditions, intermediates, materials and equipment, should be listed and justified. Provided that the quality of intermediates from variant processes is sufficiently assured, and that the final steps of the manufacturing process of the active substance is robust (and validated) and will produce a comparable active substance irrespective of the initial process steps or intermediate used, the application of such variant processes in the active substance manufacturing steps is acceptable.

Thus, if a manufacturer decides to use starting materials or intermediates from different sources and / or a different manufacturing process for the early production steps it should be shown that comparable active substances are consistently obtained in terms of relevant quality attributes irrespective of the process applied.

Comparability should also be supported taking into account the principles laid down in guidance [(Note for Guidance for Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process (CPMP/ICH/5721/03)].<sup>8</sup> Discernable differences in quality attributes should be discussed and justified in terms of product quality (e.g. product heterogeneity) as well as safety and efficacy of the finished product. Where viral safety of the active substance is mainly or solely based on virus inactivation/removal capacity of production process steps for the intermediates from different sources, this deserves particular attention.

The extent of the studies necessary to demonstrate comparability will depend on (1) the complexity of the biological active substance for example the quality attributes of heparin are well defined but those of urokinase are less well defined, and (2) how early in the production process different intermediates are introduced. Any storage periods and conditions for isolated intermediates should be set and justified by stability data.

GMP measures (e.g. contract between supplier of the starting material/intermediate(s) and manufacturer of medicinal product, audit system) should be adequate to ensure an appropriate control while allowing sourcing of starting materials or intermediate biological products from different suppliers. Respective GMP responsibilities should be clearly defined in a Quality Agreement. Reference

is made to Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use Annex 2: Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use.<sup>9</sup>

## 5. References

1. CMDh Questions & Answers Biologicals

[http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human\\_Medicines/CMD\\_h\\_/Questions\\_Answers/CMDh-269-2012-Rev0-2012\\_10.pdf](http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/Questions_Answers/CMDh-269-2012-Rev0-2012_10.pdf)

2. CMDh Overview of Biological Active substances of non recombinant origin; June 2007

[http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human\\_Medicines/CMD\\_h\\_/procedural\\_guidance/Compilation\\_Biological\\_Active\\_Substance\\_non-recombinant\\_origin.pdf](http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/procedural_guidance/Compilation_Biological_Active_Substance_non-recombinant_origin.pdf)

3. Directive 2001/83/EC as amended, Annex 1 Active substance 3.2.1.1.b General information and information related to the starting and raw materials <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0083:20070126:en:PDF>

4. CHMP Monthly report of plenary meeting of 18-21 October 2004.

[http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Committee\\_meeting\\_report/2009/10/WC50006407.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Committee_meeting_report/2009/10/WC50006407.pdf)

5. Guideline on Active Substance Master File procedure: CPMP/QWP/227/02 Rev2

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002811.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002811.pdf)

6. Report from the CMDh meeting held on 16-18 November 2009

[http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human\\_Medicines/CMD\\_h\\_/cmdh\\_pressreleases/2009\\_11.pdf](http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/cmdh_pressreleases/2009_11.pdf)

7. CHMP Monthly report; November 2009

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Committee\\_meeting\\_report/2009/12/WC50016941.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Committee_meeting_report/2009/12/WC50016941.pdf)

8. CPMP / ICH Note for Guidance on Biotechnological/Biological Products subject to changes in their Manufacturing Process (CPMP/ICH/5721/03. June 2005.

[http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open\\_document.jsp?webContentId=WC500002805](http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500002805)

9. Volume 4 Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 2: Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use; January 2013.

[http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/vol4-an2\\_2012-06\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/vol4-an2_2012-06_en.pdf)



## **Annexe 2**

“Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Ruminant DNA in Raw Materials used for Monitoring Crude Heparin for Quality”, Sharla M. Peters and al. US-FDA (June **2013**)

[Home Animal & Veterinary Science & Research Tools & Resources](#)

## Animal & Veterinary

### Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Detection of Ruminant DNA in Raw Materials used for Monitoring Crude Heparin for Quality

#### Draft

Sharla M. Peters<sup>1</sup>, Yolanda L. Jones<sup>1</sup>, Frank Perrella<sup>2</sup>, Tai Ha<sup>3</sup>, and Haile F. Yancy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U. S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, Office of Research, 8401 Muirkirk Road, Laurel, Maryland 20708, USA. <sup>2</sup>U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Office of Compliance, Silver Spring, MD 20993, USA. <sup>3</sup>Nebraska Department of Agriculture, 301 Centennial Mall South, Lincoln, Nebraska 68508, USA.

#### Abstract

A real-time PCR assay was developed for the determination of ruminant material in porcine-derived crude heparin products. The assay consists of a bead format with lyophilized primers and probe sets that identify ruminant (bovine, ovine, caprine) and porcine material and also contain an internal amplification control. The assay was verified by two analysts: the first located at the FDA and the second at an independent State laboratory. Performance of the assay was evaluated against stringent acceptance criteria developed by the U.S. FDA's Center for Veterinary Medicine's Office of Research. The heparin Multiplex Real-Time Assay (hMRTA) for the detection of ruminant DNA in porcine crude heparin passed the stringent acceptance criteria for specificity, sensitivity, and selectivity. The assay met sensitivity and reproducibility requirements previously established by the multiplex real-time PCR assay (MRTA) for detection of ruminant animal material in feed. The hMRTA, when used in porcine crude heparin, exhibited 98% sensitivity, 98% true positives, 2% false negatives. This multiplex PCR-based assay detects three ruminant species, verifies porcine origin and could be used as a screening tool or as a confirmatory assay. It is capable of providing additional assurances of crude heparin quality and will help to identify and control the species origin of the heparin supply. The control of the animal origin of crude heparin is important to ensure the safety of drugs and devices that contain heparin and to protect public health.

#### Introduction

FDA's Draft Guidance for Industry, titled "Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality<sup>1</sup>," alerts manufacturers of active pharmaceutical ingredients (APIs), pharmaceutical and medical device manufacturers of finished products, re-packers, and others, to the potential risk of crude heparin contamination.

This draft guidance provides recommendations that will help API manufacturers, pharmaceutical and medical device manufacturers of finished products, repackers, and others, to better control their use of crude heparin that might contain oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) or non-porcine material (especially ruminant material) contaminants. Among other things, the draft guidance recommends that drug or medical device manufacturers who receive and use crude heparin to manufacture drugs and medical devices containing heparin test and confirm the species origin of crude heparin in each shipment before use in the manufacture or preparation of a drug or medical device containing heparin. The test method should be qualified for use in testing crude heparin to verify the species of origin. The method should be based on good scientific principles (e.g., sufficient accuracy and specificity) and possess a level of sensitivity commensurate with the current state of scientific knowledge and risk. The following method is an assay method for measuring ruminant contamination in crude heparin using real-time polymerase chain reaction (PCR, hMRTA). This method has been evaluated for suitability using crude heparin of porcine origin and bovine reference materials. The method can be used to identify ruminant DNA in porcine-derived crude heparin. This protocol provides details of the method, reagents and equipment required to execute the real-time PCR assay for the detection of ruminant material in porcine crude heparin. An appropriate alternative method or methods can also be qualified for use in screening crude heparin for the presence of ruminant material.

#### MATERIALS AND METHODS

It is recommended that a negative template control is run (extraction, clean-up, and PCR) with each set of samples analyzed. Additionally, commercially available genomic DNA (bovine, porcine, caprine, and ovine) should be run as a positive control on each lot of BioGX Ruminant and Porcine Beads upon receipt.

##### 1. DNA Extraction

###### Introduction:

Instructions for isolating DNA from 0.5 ml of dry crude heparin are described below. Read this entire SOP before starting the purification procedure. This method uses the ChargeSwitch® gDNA Rendered Meat Purification Kit by Invitrogen (Carlsbad, CA). All reagents, pipette tips, and microcentrifuge tubes should be DNase free. Tips should also be aerosol resistant tips, reducing the chance for cross contamination at all steps of the method, from DNA extraction to PCR amplification. Because of the dry powder matrix it is recommended that procedure step 1.2.a is performed under a hood in a separate location from the DNA extraction, clean-up and PCR.

**Note: PCR testing of crude heparin should be performed prior to any treatment (e.g., chemical oxidation) that could compromise the integrity of the DNA in the sample such that PCR species**

**identification would be compromised.****1.1. Required Materials:****Kits:**

ChargeSwitch® gDNA Rendered Meat Purification Kit (Product #CS400-100)  
 PowerClean® DNA Clean-Up Kit (Product# 12877-50)  
 BioGX Ruminant and Porcine Beads (Product # 204-0002)

**Equipment Needed:**

Micro centrifuge  
 Heat Block  
 Nuclease Free Water  
 Vortex  
 Invitrogen Magna Rack  
 2.0 mL Tubes  
 Smart-Cycler  
 Smart Cycler centrifuge  
 Smart Cycler cooling block  
 SmartCycler 25 µL reaction tubes

**1.2. Procedure**

- a. Add a well-mixed heparin sample up to the 0.5 mL sample line of the 2 mL microcentrifuge tube.  
**\*Critical Step: Aliquot only one sample at a time and DO NOT open the next microcentrifuge tube and source heparin sample until prior sample is completely measured.**
- b. Add 1 mL of **ChargeSwitch Lysis Buffer** to sample. Tip the tube at a slight angle while filling the tube with lysis buffer.
- c. Add 100 µL of **ChargeSwitch SDS** to each tube. Vortex the tube for 5 seconds.
- d. Incubate at 95°C (water bath or heat block) for 5 minutes.
- e. Add 400 µL of **ChargeSwitch Precipitation Buffer (N5)** to the lysate. Vortex the tube for 5 seconds.
- f. Place the tubes on ice for 5 minutes to precipitate proteins.
- g. Centrifuge the tube at 16,100 x g for 5 minutes at room temperature to pellet the debris.
- h. Transfer 1200 µL of supernatant from the tube to a new 2 mL microcentrifuge tube.
- i. Vortex the tube containing the **ChargeSwitch Magnetic Beads** to fully re-suspend the beads in the storage buffer.
- j. Add 200 µL of **ChargeSwitch Detergent** to the tube of lysate.
- k. Add 40 µL of resuspended **ChargeSwitch Magnetic Beads**.
- l. Mix gently by pipetting up and down 5 times.
- m. Incubate the tube at room temperature for 1 minute.
- n. Place the tube on the MagnaRack until ChargeSwitch Magnetic Beads. have formed a tight pellet and the supernatant has cleared (approximately 1 minute)
- o. Without removing the tube from the magnet, carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the bead pellet. When aspirating, angle the pipette tip so that it is pointed away from the pellet.
- p. Remove the tube from the magnet.
- q. Add 1 mL of **ChargeSwitch Wash Buffer** to the tube and mix gently by pipetting up and down 5 times.
- r. Place the tube on the magnet for approximately 1 minute until the beads have formed a pellet and the supernatant is clear.
- s. Without removing the tube from the magnet, carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the bead pellet. When aspirating, angle the pipette tip so that it is pointed away from the pellet.
- t. Remove the tube from the magnet.
- u. Add 750 µL of **ChargeSwitch Wash Buffer** to the tube and mix gently by pipetting up and down 5 times.
- v. Place tube on the magnet for approximately 1 minute until the beads have formed a pellet and the supernatant is clear.
- w. Without removing the tube from the magnet, carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the bead pellet. When aspirating, angle the pipette tip so that it is pointed away from the pellet.
- x. Add 750 µL of **ChargeSwitch Wash Buffer** to the tube and mix gently by pipetting up and down 5 times.
- y. Place tube on the magnet for approximately 1 minute until the beads have formed a pellet and the supernatant is clear.
- z. Without removing the tube from the magnet, carefully aspirate and discard the supernatant without disturbing the bead pellet. Remove all the supernatant after the final wash.
- aa. Remove the tube containing the pelleted magnetic beads from the magnet. There should be no supernatant in the tube.
- ab. Add 75 µL of **ChargeSwitch Elution Buffer (E5)** to the tube.

- ac. Pipet up and down gently 10 times using an adjustable pipette to resuspend the ChargeSwitch Magnetic Beads.
- ad. Incubate at room temperature for 1 minute.
- ae. Place the tube on the magnet for 1 minute until the beads have formed a tight pellet and the supernatant is clear.
- af. Without removing the tube from the magnet, carefully transfer the supernatant containing the DNA to a new, sterile 2 mL microcentrifuge tube without disturbing the pellet. When pipetting, angle the pipette tip so that it is pointed away from the pellet.
- ag. Discard the used ChargeSwitch Magnetic Beads.

\* DNA should be stored at -20°C or continue to DNA Clean-up

## 2. DNA Clean-Up

### Introduction:

Instructions for removing PCR inhibitors (e.g., heparin) from previously isolated DNA from crude heparin are described below. Read this entire SOP before starting the clean-up procedure. This method uses the PowerClean® DNA Clean-Up Kit by MoBio Laboratories (Carlsbad, CA). All reagents and microcentrifuge tubes are DNase free and provided by the company.

### 2.1. Procedure

- a. Add 75 µL of nuclease free water to the DNA sample.
- b. Add 70 µL of **PowerClean DNA Solution 1** to DNA. Gently invert 3-5 times to mix.
- c. Add 20 µL of **PowerClean DNA Solution 2** and invert 3-5 times to mix.  
**Note:** Check **PowerClean DNA Solution 2**. If it has precipitated, heat to 60°C and gently invert the tube periodically until it has completely dissolved. Do not vigorously shake as this may result in foaming. This solution may be used while still warm.
- d. Add 85 µL of **PowerClean DNA Solution 3** and invert 3-5 times to mix. Incubate 4°C for 5 minutes.
- e. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.
- f. Avoiding pellet, transfer the entire supernatant into a clean 2 mL Collection Tube (provided).
- g. Add 70 µL of **PowerClean DNA Solution 4** and invert 3-5 times to mix. Incubate at 4°C for 5 minutes.
- h. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.
- i. Avoiding pellet, transfer the supernatant into a clean 2 mL collection tube (provided)
- j. Shake to mix **PowerClean DNA Solution 5**. Add 800 µL of PowerClean DNA Solution 5 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
- k. Load approximately 600 µL of the supernatant onto spin filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature into a clean 2 mL Collection Tube (provided)
- l. Discard flow through. Add remaining 600 µL supernatant to spin filter and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.
- m. Discard flow through. Add 500 µL of **PowerClean DNA Solution 6** to spin filter and centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature.
- n. Discard flow through.
- o. Centrifuge spin filter at 13,000 x g for 2 minutes at room temperature.
- p. Carefully place spin filter in new 2 mL collection tube (provided). Avoid splashing any PowerClean DNA Solution 6 onto spin filter.
- q. Add 75 µL of **PowerClean DNA Solution 7** to center of white filter membrane.
- r. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature.
- s. Discard spin filter. Store at -20°C or continue to PCR amplification.

## 3. Real-Time PCR Amplification

This procedure is designed to analyze presence of ruminant DNA in porcine-derived heparin samples using the SmartCycler from Cepheid. Using other platforms will require the appropriate modification to validate this portion of the SOP.

### 3.1. Real-Time Assay Preparation

- a. Remove re-sealable pouch of Sample-Ready Beads from refrigerator. Open pouch by tearing off the sealed area at the top of the pouch at the notches.
- b. Remove as many tubes as needed from the pouch and gently open each tube.
- c. Add 25 µL of nuclease free water to each tube, tip mix, and close tube lids.
- d. Using a microcentrifuge, quickly spin all tubes (5 seconds).
- e. A bead blank (bead +water/no DNA) must be analyzed with each set of samples analyzed.

### 3.2. Procedure

- a. Aliquot 25 µL of the previously prepared supermix (bead and water) to a SmartCycler PCR reaction tube.
- b. Add 1 µL of sample to each corresponding PCR reaction tube.
- c. Cap the tubes and spin in the SmartCycler centrifuge (5 seconds).
- d. Place the PCR tube in each well of the SmartCycler block and close individual lids.
- e. Prepare Run Program:
- f. Click Create Run Icon. Select Dye Set FCTC.
- g. Select protocol (see section 3.3).
- h. Select appropriate number of sites (i.e., number of PCR tubes in run).
- i. Give each site a Sample ID according to components in each tube.
- j. Click Start Run.

Note: A positive result requires a cycle threshold (Ct) value.

### 3.3. PCR Cycling Conditions

This protocol must be set prior to beginning a PCR run. Save parameters using a unique name.

PCR Program:

Stage 1: 95.0°C for 120 seconds (optics off)

Stage 2: 45 cycles

95.0°C for 10 seconds (optics off)

56.0°C for 60 seconds (optics on)

Note: The Ct value for analysis should be set at the default value of 30.

### 4. Interpretation of Results

The FCTC dye set is used for fluorescence monitoring. A positive result for ruminant DNA consists of a sample having a Ct value in the FAM channel before 45 cycles. A positive result for porcine material consists of a positive Ct value found in the TxR channel. The Internal Amplification Control (IAC) reports in the Cy5 channel and helps to mitigate false negative reporting. Many different heparin samples types contain PCR inhibitors. This test includes an IAC to ensure conditions are favorable for PCR, thus minimizing the reporting of false-negative results due to inhibition of the hot start polymerase. Specifically, the IAC is included to determine if PCR inhibition is present in samples that report a negative result. The IAC primers and probe target a synthetic sequence that is included in the reaction mix.

When no PCR inhibition is present from the sample and in the absence of amplification of targets, the IAC should produce signal with a Ct value between 32 and 37 cycles. If the sample targets are present at high concentrations, the IAC may or may not report amplification due to competition. This is normal.

If the IAC is delayed beyond a Ct value of 37 or does not report at all in the absence of target amplification, the samples may contain PCR inhibitors that are preventing target detection. If this event is observed, a re-extraction and additional clean-up using a new aliquot of the stock crude heparin sample will be required.

Ruminant positive sample results should be confirmed by testing the same DNA sample by PCR two additional times where all three test results are positive.

### CONCLUSIONS

This method presents a protocol to perform a rapid multiplex real-time assay for the detection of ruminant material in porcine-derived crude heparin. The evaluation of the hMRTA included an assessment of the specificity, sensitivity, and selectivity. An additional trial of the hMRTA was successfully conducted, in a blinded manner, by an external laboratory for peer verification. The hMRTA successfully passed the in-house evaluation as well as the external peer verification. The hMRTA accurately detects 0.5% (wt. /wt. basis) ruminant (cow, sheep, and goat) material in porcine crude heparin, as well verifies porcine origin of the crude heparin.

Page Last Updated: 05/22/2013

Note: If you need help accessing information in different file formats, see Instructions for Downloading Viewers and Players.


[Accessibility Contact](#) [FDA Careers](#) [FDA Basics](#) [FOIA](#) [No Fear Act](#) [Site Map](#) [Transparency Website Policies](#)

U.S. Food and Drug Administration  
10903 New Hampshire Avenue  
Silver Spring, MD 20993  
Ph. 1-888-INFO-FDA (1-888-463-6332)  
Email FDA



For Government For Press

Combination Products Advisory Committees Science & Research Regulatory Information Safety Emergency  
Preparedness International Programs News & Events Training and Continuing Education  
Inspections/Compliance State & Local Officials Consumers Industry Health Professionals Search FDA

 U.S. Department of **Health & Human Services**

---

**Links on this page:**

1. </downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291390.pdf>

### **Annexe 3**

“Guidance for Industry Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality”, June **2013**

---

# **Guidance for Industry**

## **Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality**

**U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)  
Center for Veterinary Medicine (CVM)  
Center for Devices and Radiological Health (CDRH)**

**June 2013**

**Current Good Manufacturing Practice (CGMP)**



# Guidance for Industry

## Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality

*Additional copies are available from:*

*Office of Communications  
Division of Drug Information, WO51, Room 2201  
Center for Drug Evaluation and Research  
Food and Drug Administration  
10903 New Hampshire Ave.  
Silver Spring, MD 20993  
Phone: 301-796-3400; Fax: 301-847-8714  
druginfo@fda.hhs.gov*

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

*and/or*

*Communications Staff, HFV-12  
Center for Veterinary Medicine  
Food and Drug Administration  
7519 Standish Place  
Rockville, MD 20855  
Phone: 240-276-9300*

<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>

*and/or*

*Division of Small Manufacturers, International, and Consumer Assistance  
Center for Devices and Radiological Health  
Food and Drug Administration  
10903 New Hampshire Avenue, Silver Spring, MD 20993.  
Phone: 301-796-5680 or 1-800-638-2041  
Fax: 301-847-8149*

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/default.htm>  
[dsmica@fda.hhs.gov](mailto:dsmica@fda.hhs.gov)

**U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)  
Center for Veterinary Medicine (CVM)  
Center for Devices and Radiological Health (CDRH)**

**June 2013**

**Current Good Manufacturing Practice (CGMP)**

**TABLE OF CONTENTS**

- I. INTRODUCTION.....1**
- II. BACKGROUND.....2**
  - A. Heparin Contamination..... 2*
  - B. Regulatory Authority..... 3*
- III. Recommendations .....5**

## **Guidance for Industry<sup>1</sup>**

# **Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin for Quality**

This guidance represents the Food and Drug Administration's (FDA's) current thinking on this topic. It does not create or confer any rights for or on any person and does not operate to bind FDA or the public. You can use an alternative approach if the approach satisfies the requirements of the applicable statutes and regulations. If you want to discuss an alternative approach, contact the FDA staff responsible for implementing this guidance. If you cannot identify the appropriate FDA staff, call the appropriate number listed on the title page of this guidance.

## **I. INTRODUCTION**

This guidance is intended to alert manufacturers of active pharmaceutical ingredients (APIs), pharmaceutical and medical device manufacturers of finished products, repackers, and others to the potential risk of crude heparin contamination.<sup>2</sup>

This guidance provides recommendations that will help API manufacturers, pharmaceutical and medical device manufacturers of finished products, repackers, and others, to better prevent the use of crude heparin that might contain over-sulfated chondroitin sulfate (OSCS)<sup>3</sup> or non-porcine ruminant material contaminants. It is important to monitor the use or development of test methods for crude heparin in addition to those set forth for heparin sodium API in the United States Pharmacopeia (USP). It is also important to identify and control the animal origin of crude heparin and confirm the species origin of heparin. This is consistent with the current USP

---

<sup>1</sup> This guidance was developed by the Center for Drug Evaluation and Research (CDER) in cooperation with the Center for Veterinary Medicine (CVM) and the Center for Devices and Radiological Health (CDRH) at the Food and Drug Administration.

<sup>2</sup> For the purpose of this guidance, we use the term *crude heparin* to mean an unrefined mixture of heterogeneous linear polysaccharides mainly composed of repeating units of highly sulfated disaccharides containing uronic acid, either D-glucuronic acid or L-iduronic acid, and D-glucosamine, and including various impurities extracted from mammalian tissues that requires further purification and processing before clinical use.

<sup>3</sup> *Over-sulfated chondroitin sulfate* (OSCS) is an over-sulfated form of chondroitin sulfate (CS) that contains an unusual type of sulfation not found in any natural source of CS. Glycosaminoglycans are polysaccharides containing repeating disaccharide units composed of alternating sulfated residues of N-acetylgalactosamine and D-glucuronic acid. Although CS is a naturally occurring glycosaminoglycan (e.g., derived from cartilage byproducts), OSCS is a semi-synthetic derivative of CS made by the chemical sulfonation of native CS. Thus, OSCS typically contains two to three additional sulfate groups per disaccharide unit compared to chondroitin sulfate. For the purpose of this guidance, we use the term *OSCS* to mean over-sulfated chondroitin sulfate and related over-sulfated glycosaminoglycan analogs.

## *Contains Nonbinding Recommendations*

monograph for heparin sodium (USP33-NF28 Supplement 1 Reissue), which states: “Label [the heparin sodium] to indicate the tissue and the animal species from which it is derived.” The identification of the animal origin of heparin has been studied by physico-chemical, immunological, and polymerase chain reaction (PCR) methods. Notwithstanding certain limitations, these methods have the potential to detect ruminant material contaminants in porcine heparin. Some of these methods (e.g., PCR, immunochemical) could be used to detect ruminant contamination in the raw materials intended for use in quality heparin production.<sup>4,5</sup> This guidance outlines the importance of testing for contamination in crude heparin — testing that should be performed in addition to the USP monograph tests set forth for heparin sodium API (used to make unfractionated and low molecular-weight heparin) to detect OSCS.<sup>6</sup>

FDA’s guidance documents, including this guidance, do not establish legally enforceable responsibilities. Instead, guidance describes the Agency’s current thinking on a topic and should be viewed only as recommendations, unless specific regulatory or statutory requirements are cited. The use of the word *should* in Agency guidance means that something is suggested or recommended, but not required.

## **II. BACKGROUND**

### **A. Heparin Contamination**

In early 2008, FDA received reports of serious acute hypersensitivity reactions (including some resulting in death) in patients undergoing dialysis.<sup>7</sup> Further investigation as well as the sudden onset of adverse events suggested the contamination of heparin sodium for injection as a common factor among the cases. In April 2008, after extensive analysis and screening, FDA identified the contaminant OSCS in heparin API manufactured in China. (A large proportion of the heparin supply was then and is now imported into the United States from foreign facilities, and manufactured with crude heparin sourced from China.) In addition to the United States, at least 10 other countries reported the presence of contaminated heparin within their supply chains. OSCS contamination of heparin appears to be an example of intentional adulteration and has also been referred to as economically motivated adulteration—i.e., heparin appeared to be intentionally contaminated with OSCS to reduce the cost of production.

---

<sup>4</sup> For the specificity of the tests, see *J.Pharm. Biomed. Anal.* 27: 305-313 (2002); *J.Pharm. Biomed. Anal.* 29: 431-441 (2002); *Molecular and Cellular Probes* 20: 250-258 (2006); *J. Food Protection* 75: 1107-1112 (2012); *Anal. Bioanal. Chem.* 404: 43-50 (2012).

<sup>5</sup> See “Heparin Multiplex Real-Time PCR Assay (hMRTA).” This analytical method for crude heparin is available at <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ScienceResearch/ToolsResources/ucm350289.htm>.

<sup>6</sup> Such testing should also include steps to monitor and confirm the species origin of heparin, as discussed above in note 4 and throughout this guidance. See discussion in section III and note 11.

<sup>7</sup> For further details, see Kishimoto, T., Viswanathan, K., Ganguly, T., et al., Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System, *N. Engl. J. Med.* 2008; 358:2457-2467; McMahon, A.W., Pratt, R.G., Hammad, T.A., et al., Description of Hypersensitivity Adverse Events Following Administration of Heparin that was Potentially Contaminated with Oversulfated Chondroitin Sulfate in early 2008, *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2010; 19: 921-923.

## *Contains Nonbinding Recommendations*

Beyond OSCS contamination, the complexity and global nature of the heparin supply chain provide other opportunities for intentional adulteration. In particular, substitution of non-porcine sources of crude heparin for porcine heparin generally raises concerns, unless specifically approved in a drug or medical device application. The potential for bovine heparin substitution, for example, could pose a risk because of possible contamination with the bovine spongiform encephalopathy (BSE)<sup>8</sup> agent derived from ruminant materials.<sup>9</sup> The control of the animal origin of crude heparin is important for ensuring the safety of drugs and devices that contain heparin and to protect public health.

The reported incidents of OSCS contamination, FDA's past discovery of OSCS in both heparin API and crude heparin, and the ruminant substitution scenario illustrate the potential risk of contamination for FDA-regulated products derived from heparin. Therefore, it is important for drug and medical device manufacturers to be diligent in ensuring that no component used in the manufacture of any drug or medical device containing heparin is contaminated with OSCS or non-porcine material.

FDA has issued a health information advisory to make the public aware of FDA's ongoing effort to monitor the safety and quality of the heparin supply.<sup>10</sup>

### **B. Regulatory Authority**

As previously discussed, the manufacture of heparin generally involves the extraction and isolation of crude heparin from porcine intestinal mucosa and further purification of heparin. Crude heparin is often intended for use as a component of other drugs, including heparin sodium for injection and low molecular weight heparins.

FDA considers the presence of OSCS or use of any non-porcine origin material, especially ruminant material (unless specifically approved in the drug application) in crude heparin, or any other form of heparin, to render that drug adulterated under section 501 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act) (21 U.S.C. 351).

Medical devices may also contain drug components such as heparin. For example, certain medical devices may be coated with heparin. FDA also considers the presence of OSCS or any non-porcine origin material, especially ruminant material (unless specifically approved in the device application) in a device containing heparin to render that product adulterated under

---

<sup>8</sup> Butler, D., British BSE Reckoning Tells a Dismal Tale, *Nature* 1998, 392: 532-533.

<sup>9</sup> Scientific Opinion on BSE Risk in Bovine Intestines, EFSA Panel on Biological Hazards, European Food Safety Authority, *EFSA Journal* 2009, (1317): 1-19.

<sup>10</sup> Public Health Update: Recall of Heparin Sodium for Injection (2/28/2008), <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm112665.htm>; Follow-up Notice to Heparin Device Manufacturers and Initial Distributors (4/8/2009), <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm135352.htm>.

### *Contains Nonbinding Recommendations*

section 501 of the FD&C Act (21 U.S.C. 351).<sup>11</sup> Under 21 CFR 820.50 and 820.80, medical device manufacturers are required to have purchasing controls and acceptance activities to ensure that devices containing heparin meet specified requirements.

FDA requires manufacturers of drugs to ensure the identity, strength, quality, and purity of their products. (See, e.g., 21 CFR 211.84 and 211.100 for finished pharmaceuticals.) FDA's guidance for industry *Q7 Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients (ICH Q7)*<sup>12</sup> provides guidance on proper material control in the manufacture of APIs and use of API starting materials, including, but not limited to, a supplier management program that ensures use of only qualified material suppliers.<sup>13</sup> Also, FDA's guidance for industry *Q9 Quality Risk Management (ICH Q9)* provides guidance regarding the application of risk management principles to the manufacture of drugs. It is critical that a firm's quality control program ensure the safety and quality of crude heparin used to make FDA-regulated products. It is equally important that firms engage in business only with appropriately qualified suppliers.

For medical devices, the control of suppliers is addressed in the Quality System Regulation under purchasing controls (21 CFR 820.50). The relationship between purchasing controls and acceptance activities (21 CFR 820.80) is vital and directly related to design controls, especially the output of risk analyses and other risk management activities (21 CFR 820.30(g)) to support better decision-making and establish the type and extent of controls commensurate to the risk.<sup>14</sup>

---

<sup>11</sup> The presence of OSCS or any non-porcine origin material, especially ruminant material, in products containing heparin may also implicate other violations of the FD&C Act.

<sup>12</sup> In November 2005, ICH renamed *Q7A Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients (ICH Q7A)* as *Q7 Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients (ICH Q7)*. We update guidances periodically. To make sure you have the most recent version of a guidance, check the CDER guidance page at <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

<sup>13</sup> See ICH Q7 section VII, Materials Management.

<sup>14</sup> In addition to purchasing controls, acceptance activities, and design controls, there are other requirements under 21 CFR Part 820. For example, manufacturers must have procedures to control and evaluate nonconforming products (21 CFR 820.90) and implement any actions necessary to correct and prevent recurrence of nonconforming product and other quality problems escalated to corrective and preventive actions (21 CFR 820.100). Ultimately, manufacturers of devices containing heparin must comply with all applicable requirements under 21 CFR Part 820.

### **III. Recommendations**

Because of the risk of potential heparin contamination in the future, it is important that manufacturers take steps to ensure that the heparin supply chain is not contaminated with OSCS or any non-porcine origin material, especially ruminant material, unless specifically approved in the drug or medical device application. FDA recommends that drug establishments that receive or use crude heparin to manufacture drug products or heparin components for use in medical devices do the following:

1. Test and confirm the species origin of crude heparin in each lot of every shipment before use in the manufacture or preparation of a drug (including APIs, drug products, and heparin components for use in a medical device).

The test method should be qualified for use in testing crude heparin and for the detection and identification of the species origin of ruminant material. The method should be based on good scientific principles (e.g., sufficient accuracy and specificity) and possess a level of sensitivity commensurate with the current state of scientific knowledge and risk. FDA has posted an assay method for measuring ruminant contamination in crude heparin using real-time polymerase chain reaction (PCR, hMRTA).<sup>15</sup> This method has been evaluated for suitability using crude heparin of porcine origin and bovine reference materials. An alternative method or methods can also be qualified for use (i.e., sufficiently validated for the degree of precision/accuracy required for its use) in screening crude heparin for the presence of ruminant material.

2. Test for OSCS in crude heparin in each lot of every shipment before use in the manufacture or preparation of a drug (including APIs, drug products, and heparin components for use in a medical device).

The test method should be qualified for use in testing crude heparin and suitable for detecting low levels of OSCS. The method should be based on good scientific principles (e.g., sufficient accuracy and specificity) and possess a level of sensitivity commensurate with the current state of scientific knowledge and risk. FDA has published an assay method for measuring OSCS contamination in crude heparin using strong anion exchange (SAX) high-pressure liquid chromatography (HPLC).<sup>16,17</sup> This method has been evaluated using crude heparin of porcine origin and OSCS reference materials. An alternative method or methods can also be qualified

---

<sup>15</sup> See “Heparin Multiplex Real-Time PCR Assay (hMRTA).” This analytical method for crude heparin is available at <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ScienceResearch/ToolsResources/ucm350289.htm>.

<sup>16</sup> See Analysis of crude heparin by <sup>1</sup>H-NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 921-926 (2010). This HPLC method has a limit of detection for OSCS of less than 0.1 percent. This analytical method for crude heparin is available at <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/UCM206230.pdf>.

<sup>17</sup> For another assay method for detecting OSCS in crude heparin, see, Sommers, C.D., D.J. Mans, L.C. Mecker, and D.A. Keire. 2011. Sensitive Detection of Oversulfated Chondroitin Sulfate in Heparin Sodium or Crude Heparin with a Colorimetric Microplate Based Assay. *Anal. Chem.* 83: 3422-3430.

### *Contains Nonbinding Recommendations*

for use (i.e., sufficiently validated for the degree of precision/accuracy required for its use) in screening crude heparin for the presence of OSCS.

3. Know the identity and role of the actual manufacturer of crude heparin and any repackers and distributors who handle crude heparin before receipt and use.

Manufacturers of APIs, finished drug products, and heparin components for use in medical devices should sufficiently audit<sup>18</sup> and qualify their crude heparin suppliers to ensure conformance to appropriate quality standards.

4. Employ the controls described in ICH Q7 to prevent the use of crude heparin containing OSCS or ruminant or unlabeled sources of crude heparin and to fully and promptly investigate and resolve deviations and failures of quality, especially identity and purity.
5. Reject for use any crude heparin found to contain any amount of OSCS, or to be derived from, in any amount, ruminant mucosa (unless approved in the drug application). If imported into the United States, control and properly dispose of any such crude heparin or heparin products in which it was used and notify the local FDA district office of the finding.<sup>19</sup>

---

<sup>18</sup> See, e.g., CDRH Quality System Audits Medical Device Quality Systems Manual, available at <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/PostmarketRequirements/QualitySystemsRegulations/MedicalDeviceQualitySystemsManual/ucm122726.htm>.

<sup>19</sup> Applicants and/or manufacturers must comply with relevant postmarket requirements (e.g., for human drugs, 21 CFR 314.81(b)(1)(ii); for animal drugs, 21 CFR 514.80(b); for medical devices, 21 CFR 803.50).